CHEMISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAU VON TETRAHYDRONEOPTERIN

von

Wolf Gutensohn

München 1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0037

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
(Direktor: Professor Dr. A. Butenandt)

Chemische und biochemische Untersuchungen zum Abbau von Tetrahydroneopterin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Wolf Gutensohn
aus
Fürstenfeldbruck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Privatdozent Dr. H. Rembold
2. Referent: Professor Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Rembold durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Rembold bin ich dankbar für sein stetiges Interesse und für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, die zur Abrundung der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Herrn Dr. H. Metzger danke ich für viele methodische Hinweise.

M e i n e n E l t e r n

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Synthese von Neopterin	4
.1 Vorversuche	4
.2 Synthese von (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin	5
3. Hydrierung von Pteridinen	5
.1 Reduktionsmethoden	5
.2 Ultraviolett-Spektren von hydrierten Pteridinen	8
4. Allgemeine Charakteristika der 6-Hydroxylumazin Bildung in Rattenleber-Homogenaten	9
.1 Gewinnung der Homogenate, Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze	9
.2 Substrat-Spezifität der Reaktion	10
.3 Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydroneopterin, Merkmale der Gesamtreaktion	10
.31 Produkte der Reaktion	10
.32 Abhängigkeit der Ausbeute von der Zeit	11
.33 Abhängigkeit der Ausbeute von der Homogenatkonzentration	11
.34 Abhängigkeit der Ausbeute vom pH	12
.35 Abhängigkeit der Ausbeute von der Substratmenge	13
.36 Hemmbarkeit der Reaktion	14
5. Die Abspaltung der Seitenkette von Tetrahydroneopterin	15
.1 Oxydative Abspaltung der Seitenkette	15
.2 Nachweis der Seitenkette als Glycerinaldehyd	18

Seite

6. Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydropterin 19

7. Desaminierung 20

8. Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydrolumazin 21

.1 Testmethode 21
.2 Charakterisierung der Reaktion 22
.21 Abhängigkeit von der Zeit 22
.22 Abhängigkeit von der Homogenatkonzentration 23
.23 Abhängigkeit vom pH 24
.24 Abhängigkeit von der Substratkonzentration 25
.3 Das Problem der nichtenzymatischen 6-Hydroxylumazin-Bildung 26
.4 Unterscheidung zwischen nichtenzymatischer und enzymatischer Reaktion 27

9. Xanthinoxydase als beteiligtes Enzym 29

.1 Anreicherungsgang 29
.2 Vergleich der beiden Enzymaktivitäten 30
.3 Test mit Xanthinoxydase aus Milch 33
.4 Ablauf der Gesamtreaktion mit zwei Enzymen 33

10. Spektroskopische Untersuchung der Reaktion. Die Struktur des enzymatischen Produkts 35

.1 UV-spektroskopische Verfolgung der enzymatischen Reaktion 35
.2 UV-spektroskopische Verfolgung der nichtenzymatischen Reaktion 37
.3 Struktur des enzymatischen Produkts 39
.4 Analoge Verhältnisse in der Pterin-Reihe 40

11. Diskussion 44

Seite

12. Zusammenfassung 47

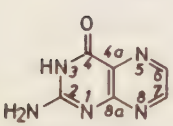
13. Experimenteller Teil 49

.1 Chromatographische Methoden 49
.2 Präparative Methoden 51
.3 Hydrierung von Pteridinen 52
.4 Oxydation von Pteridinen 53
.5 Radioaktive Meßmethoden 54
.6 Optische Meßmethoden 54
.7 Anreicherung der Xanthinoxydase 55
.8 Spezielles 56

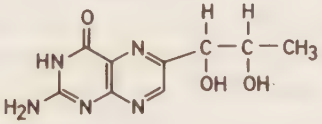
Literaturverzeichnis 57

1. Einleitung und Problemstellung

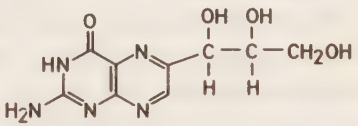
E. L. Patterson und Mitarbeiter isolierten 1955 aus menschlichem Harn ein Pterin, das sie Biopterin nannten und dem sie die Struktur eines 2-Amino-4-hydroxy-6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)-pteridins zuschrieben (1,2,3).



Pterin
(2-Amino-4-oxo-dihydropteridin)



Biopterin
(6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)-pterin)



Neopterin
(6-(D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)-pterin)

Nachdem damit auch die Identität des Biopterins mit dem schon länger bekannten Wachstumsfaktor für die Flagellate Crithidia fasciculata (4) gesichert war, stand auch ein biologischer Test zur Verfügung. (Halboptimale Wuchsstoffkonzentration: 2,5 x 10^{-5} γ/ml (5)). Die recht weit verbreitete Verbindung wurde in der Folge von verschiedenen Forschergruppen aus tierischem Material gewonnen, so aus Drosophila melanogaster (6) und Ephestia kühniella (7), aus Astacus fluviatilis (8), aus Amphibien (9) und Fischen (10), aus Ameisen (11) und schließlich aus Rattenharn (12). Bei der vergleichenden Analyse von Arbeiterinnen- und Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene fanden A. Butenandt und H. Rembold 1958 (13) als einen der wesentlichen Unterschiede die vielfach höhere Konzentration des Biopterins im Königinnenfuttersaft. Für die Determination der jungen Bienenlarven zu Königinnen ist es zwar nicht verantwortlich, wohl aber für ein normales Wachstum der Larven (14). Ebenfalls aus Weiselzellenfuttersaft isolierten H. Rembold und L. Buschmann 1963 6-(D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)-pterin, das sie als

Neopterin bezeichneten (15). Es unterscheidet sich von Biopterin durch die Struktur seiner Seitenkette und ist im Crithidia-Wachstumstest nur wenig aktiv.

Die weite Verbreitung des Biopterins, seine spezifische Wuchsstoffwirkung bei Crithidia fasciculata, sein Vorkommen im Weiselfuttersaft und seine rasche, quantitative und spezifische Resorption bei oraler Verabreichung an Ratten (12) legen es nahe, diesem Stoff - und darüber hinaus der Gruppe der unkonjugierten Pterine - allgemeinere biologische Bedeutung beizumessen. Doch war man über die Rolle dieser Verbindungen im Stoffwechsel solange auf Vermutungen angewiesen, bis man die wichtige Funktion ihrer hydrierten Derivate erkannte.

1960 konnte I. Ziegler in den Augen und der Haut von Amphibien und in Insektenaugen neben Biopterin eine äußerst lichtempfindliche Substanz nachweisen, deren Eigenschaften die Struktur eines Tetrahydrobiopterins-N(8)-ribosids wahrscheinlich machen (16). Auch aus der Blaualge Anacystis nidulans konnte ein tetrahydriertes Pteridin gewonnen werden, welches bei Inkubation mit alkalischer Phosphatase Phosphat entwickelt (17).

Nachdem es gelungen war, Tetrahydrobiopterin als Cofaktor einiger mischfunktioneller Oxygenasen zu identifizieren, hat man damit eine allgemeine Stoffwechselfunktion der hydrierten Pterine erkannt.

Das erste Ergebnis auf diesem Gebiet brachten Untersuchungen von S. Kaufman über die Phenylalanin-Hydroxylase aus Rattenleber (18). Als Cofaktoren wirken bei diesem Enzym eine Reihe von hydrierten Pterinen, z.B. Tetrahydro-6-methylpterin, Sepiapterin und Tetrahydrobiopterin, welches später von S. Kaufman als der natürliche Cofaktor erkannt wurde (19). Die Tetrahydropterine dienen als Wasserstoffdonatoren, wobei sie in die Dihydroform übergehen; Dihydrobiopterin-Reduktase, welche aus Schafsleber angereichert werden kann, regeneriert mit NADPH die Tetrahydroform.

Hydroxylierende Enzymsysteme mit ganz ähnlichen Eigenschaften fanden später A. R. Brenneman und S. Kaufman für die Umwandlung von Tyrosin in DOPA (20), A. Tietz für die Oxydation von Glyceryl-Äthern (21), O. Hayaishi für die Hydroxylierung von Tryptophan (22) und D. D. Hagerman für die Hydroxylierung von Progesteron in 17 α-Stellung (23).

Derivate des 7,8-Dihydropterins wurden als Zwischenprodukte der Folsäure-Biosynthese aus Purin-Vorstufen nachgewiesen. Ein zellfreier Extrakt aus E. coli bzw. Lactobacillus plantarum phosphoryliert zum Beispiel 7,8-Dihydro-6-hydroxymethyl-pterin mittels ATP zunächst zum entsprechenden Pyrophosphat, welches dann mit p-Aminobenzoylglutaminsäure zur Dihydrofolsäure weiterreagiert (24,25,26). Auch 7,8-Dihydroneopterin ist in beiden Systemen als Vorstufe der Dihydrofolsäure aktiv (27,28).

Bei Untersuchungen über das Verhalten von Tetrahydrobiopterin in vitro fand H. Metzger 1965 mit Rattenleber-Homogenaten einen Abbauweg, der zum 6-Hydroxylumazin führt (29,30). Aus den damaligen Ergebnissen war noch nicht zu ersehen, ob diesem Abbau auch in vivo eine Bedeutung zukommt, doch war klar, daß er in mehreren Schritten verlaufen muß. Es schien daher wünschenswert, den ganzen Ablauf in möglichst eng begrenzte, überschaubare Teilreaktionen aufzugliedern und zu prüfen, ob diese enzymatischer oder nichtenzymatischer Natur sind. Dies war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Der Abbau der hydrierten 6-Polyhydroxyalkyl-pterine zum 6-Hydroxylumazin erfolgt unter Verlust der Seitenkette. Daher war als Ausgangssubstanz ein Pterin mit ^{14}C-markierter Seitenkette erforderlich. Anstelle von Biopterin wurde Neopterin gewählt, weil es leichter zu synthetisieren ist. Diese Radiosynthese wird zunächst beschrieben. Dann werden kurz die Methoden zur Hydrierung von Pteridinen besprochen. Der größte Teil der Untersuchungen beschäftigt sich mit den einzelnen Reaktionsschritten des Abbauweges. Zuletzt wird

versucht, den gesamten Reaktionsablauf in einem Schema darzustellen, aus dem auch die Herkunft jener Pteridine hervorgehen soll, die bei biologischen Aufarbeitungen am häufigsten auftreten.

2. Synthese von Neopterin

2.1 Vorversuche

Die Synthese und Reinigung von (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin erfolgte nach der Vorschrift von H. Rembold und H. Metzger (31). In dieser Arbeit werden genaue Angaben gemacht über den Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Gesamtausbeute und auf den Anteil von Biopterin im Isomerengemisch. Bei der Radiosynthese von in der Seitenkette markiertem Neopterin ist D-Ribose der radioaktive - und damit wertvollere - Reaktionspartner. Es wurde daher in Vorversuchen mit unmarkiertem Material geprüft, wie sich eine Variation der molaren Verhältnisse der eingesetzten Substanzen (THP$^+$, D-Ribose und Hydrazinhydrat) auf die Neopterin-Ausbeute bei gleichbleibenden Reaktionsbedingungen auswirkt. Das Ergebnis dieser Vorversuche ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Man sieht, daß sich an der Neopterin-Ausbeute von rund 7% auch bei Umkehrung der molaren Verhältnisse von D-Ribose und THP nichts ändert.

+ THP = 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat.

Tab. 1 Einfluß der molaren Verhältnisse der Reaktionspartner auf die Kondensation von THP mit D-Ribose bei Anwesenheit von Hydrazinhydrat. Kondensation unter Standardbedingungen (31).

Nr.	D-Ribose	THP	Hydrazin-hydrat	Ausbeute %, bezogen auf die im Unterschuß eingesetzte Komponente	
	(mMol)	(mMol)	(mMol)	Neopterin	7-Neopterin
1+	0,82	0,38	2,3	7	21
2	0,33	0,72	2,3	7,2	23
3	0,33	0,50	2,3	8,3	18,9
4	0,33	0,35	2,3	7,1	18,4
5	0,33	0,50	1,0	3,8	13,0
6	0,33	0,50	5,0	7,7	14,2

+ Standardansatz nach H. Rembold und H. Metzger (31).

2.2 Synthese von (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin

Ausgehend von (U-^{14}C)D-Ribose wurde durch Kondensation mit THP unter Standardbedingungen und in den Konzentrationsverhältnissen der Reaktion Nr. 3 aus Tab. 1 ein Roh-Neopterin gewonnen. Dieses ergab nach dreimaliger Chromatographie über P-Cellulose 2,4 mg (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin (5,9% d.Th.) und 6,1 mg (6,7,1',2',3'-^{14}C)7-Neopterin (15% d.Th.) mit einer spezifischen Aktivität von 2,5 mC/mMol.

3. Hydrierung von Pteridinen

3.1 Reduktionsmethoden

Aus Untersuchungen über die Chemie der Folsäure ist eine Reihe von Methoden zur Reduktion von Pteridinen im Pyrazin-Ring des Moleküls bekannt, so z.B. die Reduktion mit Dithionit (32), welche zu Dihydropteridinen führt, mit Natriumboranat (33), mit Zink/HCl (18) und schließlich die kataly-

tische Reduktion (34). Die Isolierung der äußerst oxydationsempfindlichen hydrierten Substanzen bereitet bei den meist neutralen unkonjugierten Pteridinen im Gegensatz zu den sauren Verbindungen vom Typ der Folsäure einige Schwierigkeiten. Zwar sind auch hier Möglichkeiten aufgezeigt worden (25,35), doch lassen sich diese nicht ohne weiteres auf Maßstäbe von einigen hundert γ bis wenige mg übertragen. Um hohe Verluste an wertvollem radioaktivem Material zu vermeiden, wurden die Tetrahydropteridine für jeden Ansatz frisch bereitet und sofort in Lösung zugesetzt. Für die ersten Untersuchungen (29) war Tetrahydrobiopterin noch durch Boranat-Reduktion gewonnen worden, doch stellte sich bald heraus, daß die katalytische Hydrierung mit Palladiumoxid in salzsaurer Lösung vorteilhafter ist. Sie läuft rasch und quantitativ ab und führt zu einem einheitlichen Produkt.

Die Reduktionen wurden durchgeführt in einer von H. Rembold und H. Metzger (36) angegebenen Apparatur, die es erlaubt, das Einbringen und die Entnahme der Lösungen sowie das Abfiltrieren des Katalysators unter strömendem Inertgas (z.B. Wasserstoff oder nachgereinigtem Stickstoff) vorzunehmen.

Ein Bild über den Ablauf der Hydrierung läßt sich gewinnen, wenn man einem Reduktionsansatz von (U-^{14}C)Neopterin[+] (0,3 mg Neopterin + 30 mg PdO) von Zeit zu Zeit Proben entnimmt und diese in alkalischer Permanganat-Lösung oxydiert. Dabei wird nur das nichthydrierte Neopterin zur Pterin-6-carbonsäure oxydiert, nicht dagegen Tetrahydroneopterin, bei welchem offensichtlich der Tetrahydropyrazin-Ring oxydativ angegriffen wird. Die Pterin-6-carbonsäure läßt sich auf kleinen Dowex 1X8-Säulen leicht von den neutralen Bestandteilen abtrennen und mit 5%iger Ameisensäure eluieren (37). Ihre Menge wird durch Messung der Radioaktivität be-

---

[+] (U-^{14}C)Neopterin wird im folgenden als abgekürzte Bezeichnung für (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin verwendet.

stimmt; sie ist ein Maß für das zum jeweiligen Zeitpunkt im Ansatz noch nicht hydrierte Neopterin.

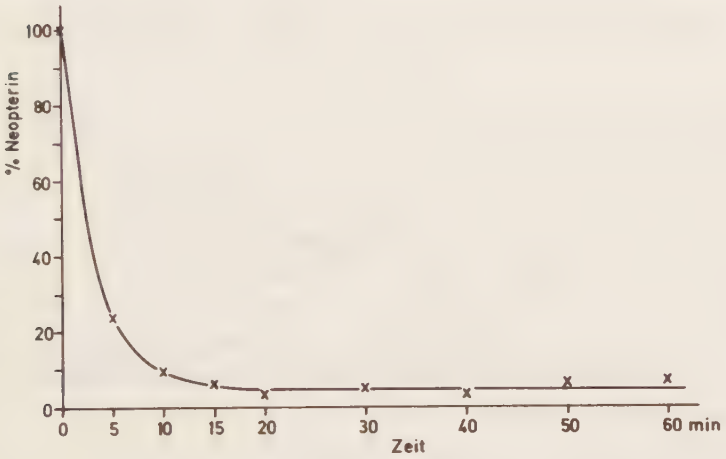


Abb. 1 Abhängigkeit der Menge nichthydrierten Neopterins (in % der ursprünglichen Konzentration) von der Zeit in einem katalytischen Hydrierungsansatz (PdO/0,1n HCl).

Abb. 1 zeigt, daß bei den gewählten Konzentrationen die Reduktion nach 20 Min. abgeschlossen ist. Ein kleiner Anteil von etwa 5% Pterin-6-carbonsäure scheint bei der Permanganat-Oxydation aus Tetrahydroneopterin zu entstehen.

Bei den folgenden Ansätzen wurden die Pteridine immer 1 Std. lang hydriert, einmal um eine vollständige Hydrierung zu gewährleisten, zum anderen, weil bei den späteren Versuchen die verwendete Menge PdO auf etwa 1/10 verringert wurde.

3.2 Ultraviolett-Spektren von hydrierten Pteridinen

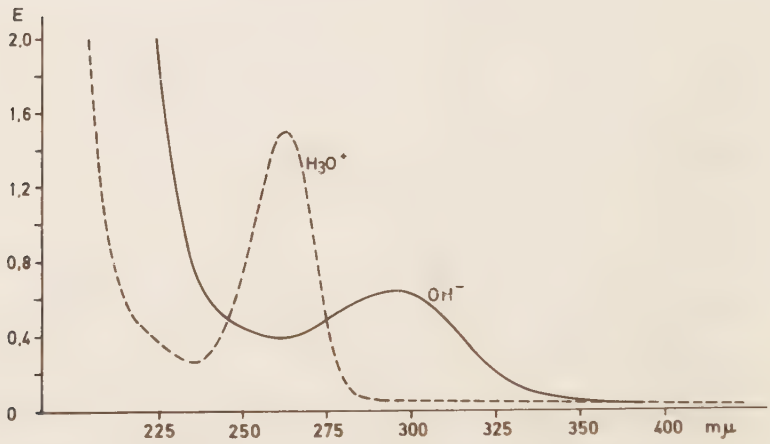


Abb. 2 UV-Spektrum von Tetrahydrolumazin in 0,3n HCl – – – –; und in 0,3 n NaOH ————.

Als Beispiel für den spektralen Typ der Tetrahydropteridine ist in Abb. 2 das UV-Spektrum von Tetrahydrolumazin wiedergegeben ($\lambda_{max\ 0,3n\ HCl}$ = 263,5 mμ; $\lambda_{max\ 0,3n\ NaOH}$ = 295 mμ). Die Spektren von Tetrahydropterin und Tetrahydroneopterin zeigen das gleiche Bild. Wie zu erwarten, tritt die längerwellige Absorption der nichthydrierten Pterine nicht mehr auf. Die Spektren zeigen mit nur einem Maximum den Typ eines substituierten Pyrimidins (THP) und sind in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur (35). Überhaupt weisen die UV-Spektren der Lumazin- und Pterin-Reihe solange keine großen Unterschiede auf, wie der Pyrazinteil nur Wasserstoff- oder Alkylreste als Substituenten trägt. Auch die UV-Spektren von Lumazin, Pterin, Biopterin und Neopterin sind einander sehr ähnlich.

4. Allgemeine Charakteristika der 6-Hydroxylumazin-Bildung in Rattenleber-Homogenaten

4.1 Gewinnung der Homogenate, Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze

Zur Bereitung der Homogenate wurden Lebern aus Ratten der Stämme Wistar und Sprague Dawley verwendet. Die Untersuchungen haben ergeben, daß Geschlecht und Alter der Tiere keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben. Die Lebern wurden in kleine Stücke geschnitten, in eine Pufferlösung gebracht - wo nicht anders vermerkt, in 0,1m Tris[+]-HCl, pH 7,5 - und in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Die Angaben in Gewichtsprozent der Homogenate beziehen sich auf das Frischgewicht der Lebern. Nach Zugabe der radioaktiven hydrierten Pteridine in neutraler oder gepufferter Lösung wurden die Proben in Reagenzgläsern oder kleinen Erlenmeyer-Kolben in einem Schüttelinkubator bei 37° unter aeroben Bedingungen inkubiert, zur Beendigung der Reaktion in wenige ml siedendes Wasser geschüttet und nochmals kurz aufgekocht. Kontrollwerte wurden unter identischen Bedingungen durch Inkubation mit hitzedenaturiertem Leberprotein der gleichen Homogenat-Konzentration gewonnen. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurden die Lösungen über die unter 3.1 schon erwähnten kleinen Dowex 1X8-Säulen chromatographiert Die neutralen Bestandteile wurden mit Wasser eluiert, das leicht saure 6-Hydroxylumazin mit 0,1%iger Ameisensäure. Diese Elution mit geringer Säurekonzentration hat den Vorteil, daß stärker saure Substanzen, z.B. Pterin-6-carbonsäure, von der Säule noch festgehalten werden. Die Ausbeuten wurden durch Messung der Radioaktivität bestimmt, die Identität des Abbauprodukts mit authentischem 6-Hydroxylumazin durch vergleichende Papierchromatographie in 4 Systemen und gegebenenfalls durch UV-Spektrum gesichert.

[+] Tris = Tris-hydroxymethyl-aminomethan

4.2 Substrat-Spezifität der Reaktion

Es ist im bisher Gesagten stillschweigend vorausgesetzt worden, daß der Abbau von Tetrahydroneopterin als Modell für den des Tetrahydrobiopterins gelten kann. Versuche, die im folgenden näher geschildert werden, haben dies bestätigt. Damit erhebt sich die Frage nach der Substrat-Spezifität der Reaktion. Eine Reihe von qualitativen Experimenten hat ergeben, daß man auch ausgehend von Tetrahydropterin, Tetrahydro-6-hydroxymethyl-pterin und Tetrahydropterin-6-carbonsäure zu 6-Hydroxylumazin gelangen kann. Dies zeigt, daß die Reaktion bezüglich des Substituenten in der 6-Stellung des Tetrahydropterins keine hohe Spezifität aufweist.

4.3 Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydroneopterin, Merkmale der Gesamtreaktion

4.31 Produkte der Reaktion

Tetrahydroneopterin liefert mit Leberhomogenat folgende Produkte: 6-Hydroxylumazin, welches, wie schon unter 4.1 erwähnt, durch Chromatographie über Dowex 1X8 von neutralen Bestandteilen abgetrennt wird. Diese können an P-Cellulose weiter aufgeteilt werden. Papierchromatographisch lassen sich dann nachweisen: Neopterin, Pterin und ein gelblichgrün fluoreszierender Stoff, der später (10.4) als 7,8-Dihydroxanthopterin identifiziert werden konnte.

Mit Ausnahme des 6-Hydroxylumazins treten alle diese Verbindungen auch in Kontrollansätzen mit denaturiertem Leberprotein auf. Die nun folgenden Untersuchungen befassen sich zunächst nur mit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin als dem Produkt der biologischen Reaktion.

4.32 Abhängigkeit der Ausbeute von der Zeit

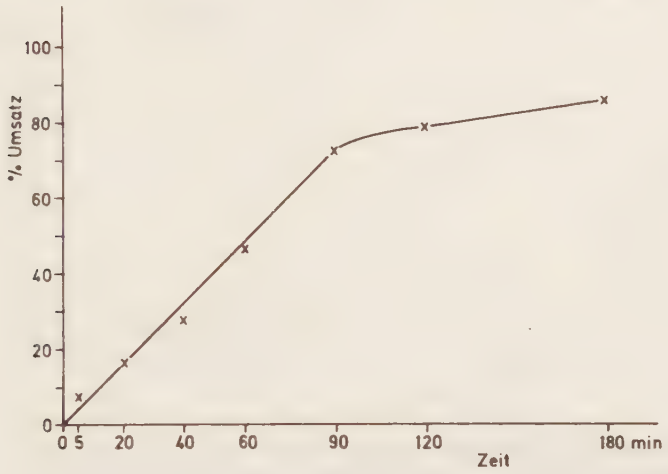


Abb. 3 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Inkubationszeit für 0,1%iges Homogenat. Jede Probe enthält 2 ml des Homogenats und 35 γ (0,14 µMol, 8000 Imp/Min) (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin. Inkubation und Aufarbeitung wie unter 4.1

Der Wert "% Umsatz" bezeichnet in Abb. 3 den Anteil des 6-Hydroxylumazins an der gesamten aus dem Ansatz wiedergewonnenen Radioaktivität. Dabei ist berücksichtigt, daß dieses 6-Hydroxylumazin nur noch 2/5 der spezifischen Aktivität des (U-^{14}C)Neopterins enthält.

Die Zeitkurve zeigt bis 90 Min. einen linearen Anstieg und erreicht dann ein Plateau, welches einem fast quantitativen Umsatz entspricht.

4.33 Abhängigkeit der Ausbeute von der Homogenatkonzentration

Der Verlauf der in Abb. 4 gezeigten Homogenatkurve ist unerwartet. Normalerweise müßte auch hier nach einem linearen Anstieg ein Plateau erreicht werden. Das Absinken der Ausbeute bei höheren Homogenatkonzentrationen kann aus den bis

hierher vorliegenden Ergebnissen noch nicht geklärt werden. Diese Eigenheit des Kurvenverlaufs soll später (8.22) näher behandelt werden.

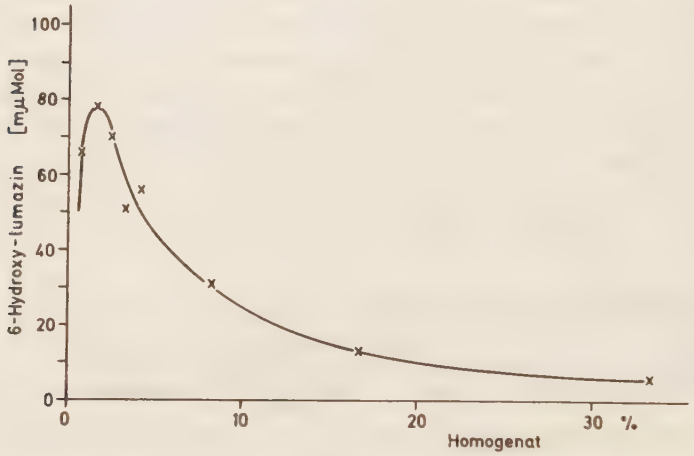


Abb. 4 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Homogenatkonzentration. Jede Probe enthält 2,4 ml Homogenat und 35 γ (0,14 μMol, 8000 Imp/Min) (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin. Inkubationszeit 20 Min. Übrige Bedingungen wie unter 4.1

Sämtliche weiteren Untersuchungen wurden nun mit Homogenatkonzentrationen zwischen 0 und 1% angesetzt.

4.34 Abhängigkeit der Ausbeute vom pH

Die pH-Kurve in Abb. 5 zeigt 2 Maxima, eines bei etwa pH 7,2 und das andere bei pH 8,5. Auch diese Besonderheit soll später besprochen werden (8.4).

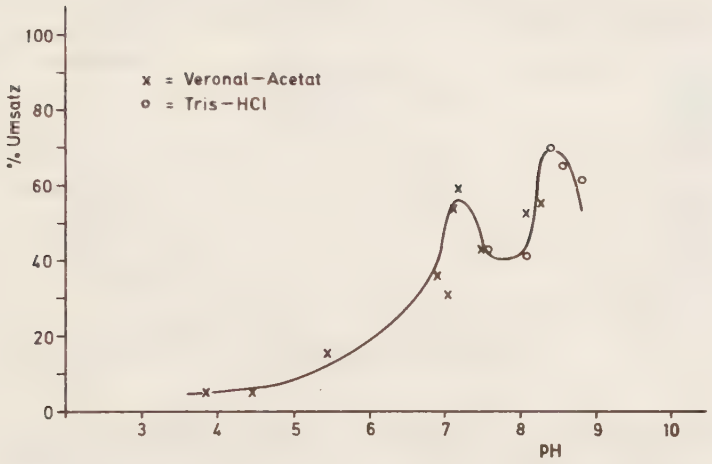


Abb. 5 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin vom pH. Jede Probe enthält 2 ml 0,9%iges Homogenat in Tris-HCl (o) oder Veronal-Acetat (x) und 35 γ (0,14 µMol, 8000 Imp/Min) (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin. Inkubationszeit 20 Min. Übrige Bedingungen wie unter 4.1

4.35 Abhängigkeit der Ausbeute von der Substratmenge

Für diese Untersuchung schien es günstiger, daß Substrat und Produkt die gleiche spezifische Radioaktivität besitzen. Deshalb wurde in diesem Falle (2-^{14}C)Tetrahydroneopterin verwendet.

Auch der Verlauf dieser Substratkurve (Abb. 6) ist ungewöhnlich. Selbst bei 226 γ (0,9 µMol) Tetrahydroneopterin pro mg Leber-Frischgewicht ist noch keine Substratsättigung erreicht.

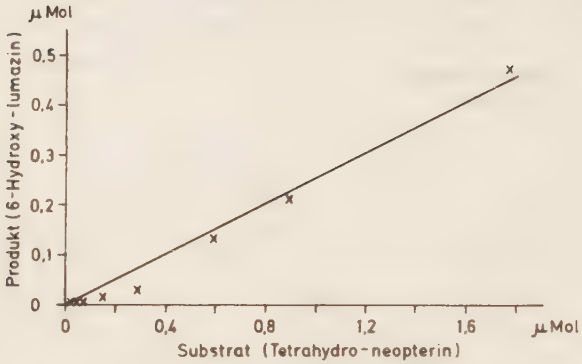


Abb. 6 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Substratmenge. Jede Probe enthält 2 ml 0,1%iges Homogenat. Inkubationszeit 50 Min. Übrige Bedingungen wie unter 4.1

4.36 Hemmbarkeit der Reaktion

Die Untersuchungen über die Hemmbarkeit der Reaktion wurden durchgeführt in Ansätzen mit 3 ml 0,1%igem Homogenat und 35 γ (0,14 µMol) (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin. Die Hemmstoffe wurden in gepufferter Lösung zugesetzt, jeweils in einer Konzentrationsreihe von 1/10 der Substratkonzentration bis zum 10- oder 100-fachen Überschuß. Die Inkubationszeit betrug 35 Min. Das Ergebnis der Versuche ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Nichthemmbarkeit durch die klassischen Folsäureantagonisten (Nr. 1 und 2) schließt die Beteiligung eines Enzyms vom Typ der Dihydrofolatreduktase aus. Das Ergebnis mit PCMB (Nr. 6) steht im Widerspruch zu Versuchen von H. Metzger (29), welcher bei Zugabe von PCMB - allerdings zu einem 17%igen Homogenat - eine Erhöhung der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin findet.

Tab. 2 Versuche zur Hemmung der 6-Hydroxylumazin-Bildung aus Tetrahydroneopterin in 0,1%igem Homogenat.

Nr.	Hemmstoff	Hemmstoff-Konzentration (µMol)			Hemmung	mittlere Ausbeute an 6-Hydroxy-lumazin
1	Aminopterin	0,01	bis	12,0	-	22,0 %
2	Amethopterin	0,01	"	12,0	-	20,3 %
3	2,4-Diamino-pteridin+	0,01	"	1,4	-	22,2 %
4	Aminoneopterin+	0,01	"	1,4	-	22,3 %
5	Aminobiopterin+	0,01	"	1,4	-	21,8 %
6	PCMB++	0,01	"	1,4	-	22,0 %

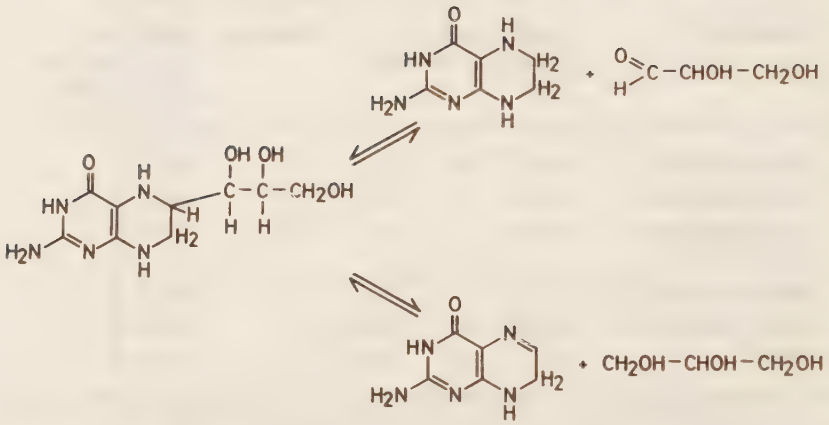
5. Die Abspaltung der Seitenkette von Tetrahydroneopterin

5.1 Oxydative Abspaltung der Seitenkette

Das Auftreten von Pterin in Kontrollansätzen (4.31) gibt einen Hinweis darauf, daß in den Ablauf der Gesamtreaktion ein, wenn nicht mehrere nichtenzymatische Schritte eingeschaltet sein müssen. Dies gilt insbesondere für die Abspaltung der Seitenkette. Zunächst wäre an ionische Mechanismen vom folgenden Typ zu denken:

+ Für die Überlassung dieser Substanzen danke ich Herrn Dr. J. Eder.

++ PCMB = Parachloromercuribenzoat



Daß diese Überlegung nicht zutrifft, zeigt das Ergebnis der folgenden fünf Inkubationsansätze (0,1m Tris-HCl, pH 7,5) bei Abwesenheit von Protein:

1.) 1,7 mg (2-^{14}C)Tetrahydropterin (10 µMol) und 36 mg DL-Glycerinaldehyd (400 µMol) wurden in 4 ml Puffer 2 Stdn. lang aerob bei 37° inkubiert. Anschließend wurden eine Lösung von unmarkiertem Tetrahydroneopterin in 0,5n HCl und 1 ml einer Jod-Jodkalium-Lösung zugegeben und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt.

Die Oxydation von hydrierten Pterinen mit Jod ist eine sehr schonende Methode. Ist der Tetrahydropyrazin-Ring nur mit Wasserstoff oder Alkylresten substituiert, so führt sie zu seiner quantitativen Rearomatisierung.

Nach Neutralisieren der Lösung wurde überschüssiges Jod durch Chromatographie über Dowex 1X8 abgetrennt. Zur Trennung der Pterine wurde eine Chromatographie über P-Cellulose angeschlossen. Durch Elution mit Wasser und Messung der Absorption bei 272 mµ werden 2 Bereiche abgetrennt. Papierchromatographisch läßt sich dem ersten Neopterin, dem zweiten Pterin zuordnen. Bei der Bestimmung der Radioaktivität findet sich nur ein Gipfel, der sich genau mit dem Absorptions-

bereich für Pterin deckt. Die Neopterin-Zone enthält keine Aktivität, d.h. sämtliches Neopterin ist durch Reoxydation des zuletzt zugesetzten unmarkierten Tetrahydroneopterins entstanden. Es folgt, daß die Rückreaktion nach dem obigen Schema unter den gegebenen Bedingungen auch bei 40-fachem Überschuß eines Partners nicht stattgefunden hat.

2.) 125 γ (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin (0,5 µMol) und 36 mg DL-Glycerinaldehyd wurden in 3,2 ml Puffer 2 Stdn. lang aerob inkubiert. Nach Jod-Oxydation, Chromatographie über Dowex 1X8 und über P-Cellulose lassen sich Pterin und Dihydroxanthopterin, aber kein Neopterin nachweisen. Die Seitenkette wurde quantitativ abgespalten! Ein Gleichgewicht der oben angegebenen Art sollte durch einen 800-fachen Glycerinaldehyd-Überschuß beeinflußbar sein.

3.) Zur Prüfung der Frage, ob ein ionischer Gleichgewichtsprozeß unter Beteiligung von Glycerin vorliegt, wurde ein völlig analoger Versuch mit einem 800-fachen Glycerin-Überschuß angesetzt. Auch er brachte das gleiche Ergebnis. Die quantitative Abspaltung der Seitenkette wird nicht verhindert.

Es bestünde nun noch die Möglichkeit, daß nur unter den aeroben Inkubationsbedingungen ein oxydativer Vorgang dem ionischen den Rang abläuft. Um auch dies noch auszuschließen, wurden 2 Experimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde im Inkubationsgefäß der über der Lösung stehende Gasraum ständig mit einem schwachen Strom von Reinststickstoff gespült. Außerdem wurde das Inkubationsmedium vor der Zugabe des Tetrahydroneopterins eine halbe Stunde unter anaeroben Bedingungen vorinkubiert. Diese einfache Methode schließt zwar Spuren von Sauerstoff in der Lösung nicht aus, doch treten die Unterschiede zu den aeroben Versuchen deutlich genug hervor.

4.) In einem Vorversuch wurde (2-^{14}C)Tetrahydroneopterin 2 Stdn. lang anaerob inkubiert. Nach der üblichen Aufarbeitung durch Jod-Oxydation und Chromatographie wurden 51% Neo-

pterin und 39% Pterin nachgewiesen, d.h. die Abspaltung der Seitenkette erfolgt unter diesen Bedingungen schon wesentlich schwerer.

5.) Die spezifische Radioaktivität einer (U-^{14}C)Neopterin-Probe wurde mit 72 000 Imp/Min x µMol bestimmt. Nach der Hydrierung wurden 250 γ (1 µMol) zusammen mit 36 mg DL-Glycerinaldehyd (400 µMol) 1 Std. lang anaerob inkubiert. Nach Jod-Oxydation und Dowex-Chromatographie wurde das erhaltene Neopterin durch präparative Papierchromatographie und dreimalige Chromatographie über P-Cellulose gereinigt. Eine abermalige Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab nun den Wert 76 700 Imp/Min x µMol. Bei einem Gleichgewicht der geschilderten Art hätte die markierte Seitenkette des (U-^{14}C)Tetrahydroneopterins mit dem unmarkierten Glycerinaldehyd austauschen und die spezifische Aktivität des wiedergewonnenen Neopterins erniedrigt sein müssen. Dies war nicht der Fall.

Aus diesen Befunden folgt, daß die Abspaltung der Seitenkette des Tetrahydroneopterins eine nichtenzymatische Reaktion ist, welche an einen oxydativen Vorgang gekoppelt ist und irreversibel verläuft.

5.2 Nachweis der Seitenkette als Glycerinaldehyd

Auch bei einer oxydativen Abspaltung der Seitenkette ist Glycerinaldehyd als Spaltprodukt zu erwarten. Stellt man sich den ersten Oxydationsschritt als einen Übergang von Tetrahydroneopterin (I) zum parachinoiden Dihydroneopterin (II) vor, so wird bei der anschließenden Tautomerisierung zum 7,8-Dihydropterin (VIa) die Seitenkette als Kation austreten (bezüglich der römischen Ziffern siehe Kap. 11 und Formelschema im Anhang). Dieses Kation geht durch Abgabe eines Protons in Glycerinaldehyd über.

Um die abgespaltene Seitenkette nachzuweisen, wurde in 2 Vorversuchen (U-^{14}C)Tetrahydroneopterin mit einem großen Überschuß von DL-Glycerinaldehyd bzw. Glycerin 1 Std. lang

aerob inkubiert. Anschließend wurde der Glycerinaldehyd in sein 2,4-Dinitrophenylhydrazon, das Glycerin in sein Tribenzoat umgewandelt. Beide Derivate wurden dreimal umkristallisiert. Nur das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Glycerinaldehyds enthielt Radioaktivität.

Zur genaueren Bestimmung wurde der Versuch mit DL-Glycerinaldehyd wiederholt und das 2,4-Dinitrophenylhydrazon bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert. Die Aktivität wurde im Szintillationszähler gemessen. Wegen der gelben Farbe der Lösungen war allerdings der Quencheffekt mit 50% sehr hoch. Unter Berücksichtigung dieses Löscheffekts betrug die Impulsausbeute 10% der Theorie.

6. Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydropterin

Bei der oxydativen Abspaltung der Seitenkette von Tetrahydroneopterin ist das eine Spaltstück als Glycerinaldehyd erkannt worden, das andere müßte 7,8-Dihydropterin sein (Formelschema Anhang). Es sollte also auch mit Tetrahydropterin als Substrat - wenn dieses bei seiner Reoxydation die Stufe eines 7,8-Dihydropterins durchläuft - möglich sein, im Leber-Homogenat zu 6-Hydroxylumazin zu gelangen. Daß dies tatsächlich der Fall ist, wurde schon kurz erwähnt (4.2).

Einer genaueren Untersuchung stellt sich eine technische Schwierigkeit entgegen. Als einziges der verwendeten Tetrahydropteridine wird Tetrahydropterin sehr stark an den Palladiumoxid-Katalysator adsorbiert. Man kann dem durch Verwendung sehr geringer Mengen Katalysator und konzentrierter Pterin-Lösungen begegnen, doch ist dann die Reduktion nicht quantitativ. Pterin wird aber im Leber-Homogenat durch Xanthinoxydase in Isoxanthopterin übergeführt. Diese ebenfalls leicht saure Verbindung läßt sich säulenchromatographisch nur schwer von 6-Hydroxylumazin trennen.

Vor allem aber ist die Zugabe reproduzierbarer Substratmengen nicht gewährleistet. Die folgenden Versuche vermitteln deshalb nur einen groben Überblick.

Eine 15-minütige aerobe Inkubation von (2-^{14}C)Tetrahydropterin in 0,5%igem Homogenat ergibt nach Chromatographie über Ecteola- und P-Cellulose folgende papierchromatographisch nachweisbare Produkte: 6-Hydroxylumazin + Isoxanthopterin (34,2%), Dihydroxanthopterin (25,2%) und Pterin (14,5%). Der Rest verteilt sich auf nicht identifizierte saure und basische Stoffe. Bei Kontrollansätzen fehlen 6-Hydroxylumazin und Isoxanthopterin.

Eine Zeitkurve für die 6-Hydroxylumazin-Bildung in 0,2%igem Homogenat mit 80 γ Tetrahydropterin pro Ansatz zeigt bis 60 Min. einen linearen Anstieg, welcher etwas steiler verläuft, als jener für 0,1%iges Homogenat bei Tetrahydroneopterin als Substrat (4.32). Das Plateau wird bei etwa 27% Umsatz erreicht.

Die Abhängigkeit der 6-Hydroxylumazinbildung von der Homogenatkonzentration zeigt das vom Tetrahydroneopterin her bekannte Bild (4.33) mit einem Maximum der Ausbeute bei 2%igem Homogenat und einem Absinken derselben bei höheren Proteinkonzentrationen.

7. Desaminierung

Mit einem Ersatz der Aminogruppe in Stellung 2 des Pterins durch eine Oxo-dihydro-Gruppierung erfolgt der Übergang von der Pterin-Reihe zur Lumazin-Reihe. Dieser Desaminierungsschritt ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Er wird katalysiert durch eine Pterindesaminase, welche sich nach Untersuchungen von F. Simmersbach (38) aus Rattenleberextrakten anreichern läßt. Sie ist in ihren Eigenschaften der Guanase aus Rattenleber sehr ähnlich, aber nicht mit ihr identisch.

Auf welcher Stufe der Gesamtreaktion der Desaminierungsschritt abläuft, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht entscheiden. Theoretisch wäre an drei Möglichkeiten zu denken:

1. Tetrahydroneopterin $\xrightarrow{\text{Enzym}}$ Tetrahydro-6-trihydroxypropyllumazin
2. Tetrahydropterin $\xrightarrow{\text{Enzym}}$ Tetrahydrolumazin
3. Dihydropterin $\xrightarrow{\text{Enzym}}$ Dihydrolumazin

Der erste Weg ist weniger wahrscheinlich. H. Metzger gelang es nicht, bei entsprechenden Versuchen mit Tetrahydrobiopterin das Lumazin-Analoge des Biopterins zu fassen (39). Zwischen den Möglichkeiten 2. und 3. kann in aeroben Inkubationsansätzen mit Tetrahydropterin nicht unterschieden werden, da die Desaminierung der Oxydation sowohl vorausgehen, als auch nachfolgen kann. Höchstwahrscheinlich katalysiert das Enzym beide Schritte, denn nach den Ergebnissen von F. Simmersbach wird sogar Pterin desaminiert. Das Enzym weist also bezüglich des Hydrierungsgrades im Pyrazin-Ring keine hohe Spezifität auf.

8. Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydrolumazin

8.1 Testmethode

Als letzter wichtiger Schritt in der Reaktionsfolge zum 6-Hydroxylumazin war die Einführung der Sauerstoff-Funktion in Stellung 6 zu untersuchen. Dies erschien möglich, als es sich zeigte, daß 6-Hydroxylumazin in Leberhomogenaten auch aus Tetrahydrolumazin gebildet wird. Große Vorteile bringt hierbei die Tatsache, daß in einem aufgearbeiteten Ansatz außer dem Reaktionsprodukt und dem durch Reoxydation des Substrats entstandenen Lumazin keine weiteren Stoffe auftreten. Auf Grund der verschiedenen UV-Spektren beider Sub-

stanzen läßt sich eine optische Bestimmungsmethode für 6-Hydroxylumazin ausarbeiten und deshalb unmarkiertes Material verwenden.+

Folgender Test wurde angewandt: Lumazin wird wie üblich (3.1) reduziert und in 2 ml Homogenat inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 30% Trichloressigsäure wird der Ansatz gestoppt und kurz aufgekocht. Nach Stehen über Nacht wird das denaturierte Protein abfiltriert, die Probe auf ein Volumen von 4 ml gebracht und die Extinktion bei 365 mμ bestimmt (die Extinktion von Lumazin ist bei 365 mμ im Sauren vernachlässigbar klein). Mit der von W. Pfleiderer (40) für dieses Maximum angegebenen Molextinktion (ε = 5500) wird die Ausbeute an 6-Hydroxylumazin berechnet. Zur Korrektur der Werte wird die Extinktion der Kontrollansätze bei 365 mμ herangezogen.

8.2 Charakterisierung der Reaktion

8.21 Abhängigkeit von der Zeit

Der Wert bei 90 Min. in Abb. 7 entspricht für 2%iges Homogenat einem Umsatz von 59%.

+ Für die Überlassung größerer Mengen Lumazin danke ich Herrn Dr. H. Metzger.

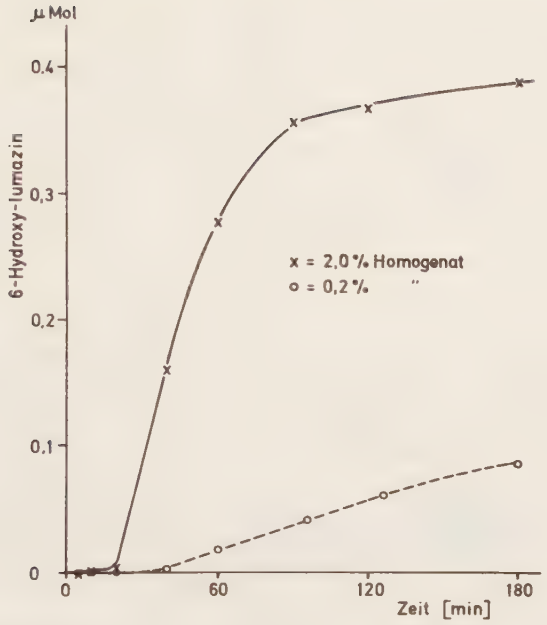


Abb. 7 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Inkubationszeit für 2%iges ———— und 0,2%iges — — — — — Homogenat. Jede Probe enthält 100 γ (0,61 µMol) Tetrahydrolumazin. Test wie unter 8.1

8.22 Abhängigkeit von der Homogenatkonzentration

Die charakteristische Form der Homogenatkurve (4.33) kehrt hier (Abb. 8) wieder. Es konnte gezeigt werden, daß auch die Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydrolumazin nur unter aeroben Bedingungen vonstatten geht. Daher lag es nahe, den Grund für das Absinken der Ausbeute bei höheren Homogenatkonzentrationen in einem Sauerstoffmangel zu suchen. Erschwerte Diffusion, mangelnde Durchmischung der Lösung und die Konkurrenz anderer Sauerstoff-verbrauchender Prozesse mögen die Ursachen dafür sein.

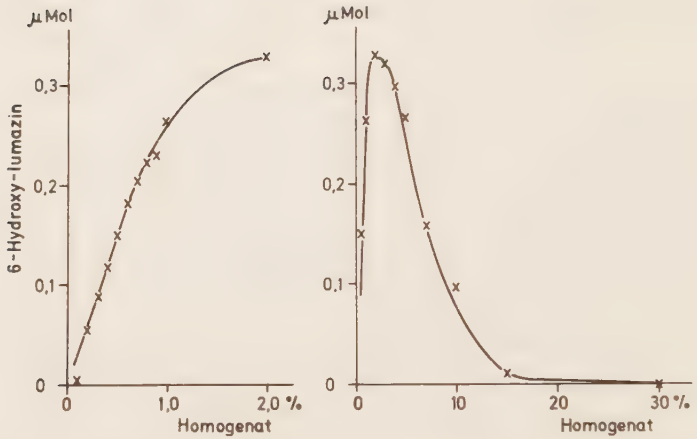


Abb. 8 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Homogenatkonzentration zwischen 0 und 2% (links) und zwischen 0 und 30% (rechts). Jede Probe enthält 100 γ (0,61 µMol) Tetrahydrolumazin. Inkubationszeit 90 Min. Test wie unter 8.1

Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht folgender Versuch: Zwei Proben eines 10%igen Homogenats wurden unter den gleichen Bedingungen, wie unter Abb. 8 angegeben, inkubiert, die eine wie gewöhnlich an Luft, die andere unter einer Sauerstoffatmosphäre, die ganz analog den anaeroben Inkubationsversuchen (5.1) erzeugt wurde. Die Probe an der Luft brachte einen Umsatz, der genau der Kurve in Abb. 8 entspricht. Unter Sauerstoff war die Ausbeute auf das 3,3-fache gestiegen.

8.23 Abhängigkeit vom pH

Die enzymatische Reaktion (Abb. 9) zeigt nur ein Maximum bei pH 8,0.

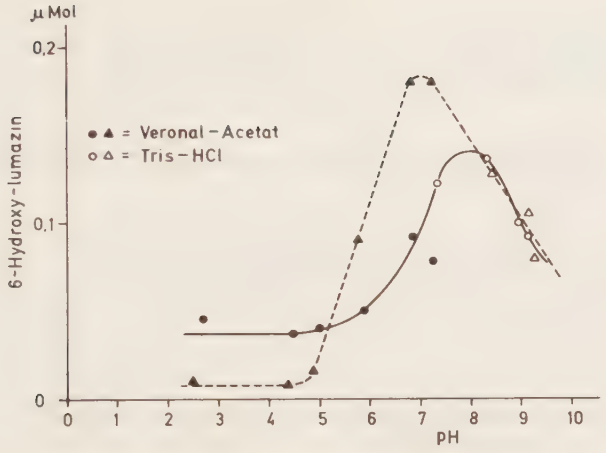


Abb. 9 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin vom pH für 0,5%iges Homogenat ———— und für reinen Puffer — — — — —. Veronal-Acetat (● ▲); Tris-HCl (○ △). Jede Probe enthält 100 γ (0,61 µMol) Tetrahydrolumazin. Inkubationszeit 90 Min. Test wie unter 8.1

8.24 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

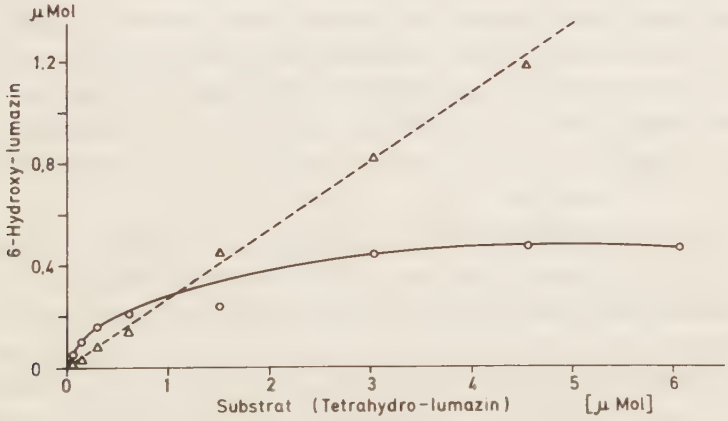


Abb. 10 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Substratkonzentration für 0,5%iges Homogenat ———— und für hitzedenaturiertes 0,5%iges Homogenat — — — — — . Inkubationszeit 90 Min. Test wie unter 8.1

Im Gegensatz zu Abb. 6 zeigt diese Substratkurve für die enzymatische Reaktion einen normalen Verlauf. Die Kurve für die Kontrollwerte wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

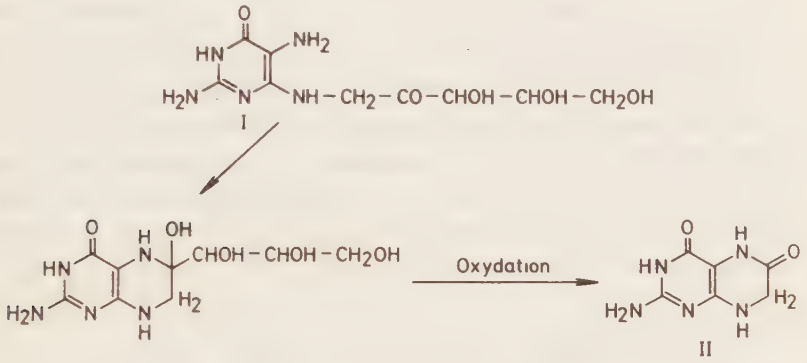
8.3 Das Problem der nichtenzymatischen 6-Hydroxylumazin-Bildung

Bei dem Versuch, durch Inkubation von Tetrahydrolumazin mit denaturiertem Homogenat Kontrollwerte zur Substratkurve zu erhalten, zeigte es sich, daß auch auf nichtenzymatischem Wege 6-Hydroxylumazin gebildet wird, und zwar unter den Bedingungen der Abb. 10 unabhängig von der Substratmenge mit einer Ausbeute von 27%. Dieses Ergebnis schien zunächst überraschend, doch sind in der Literatur solche Reaktionen beschrieben:

Bei der Reoxydation von Tetrahydropterin bzw. -lumazin wird zuerst die 5,6-Doppelbindung gebildet. Diese ist einem nucleophilen Angriff in Stellung 6 leicht zugänglich. So beschreiben H. S. Forrest und Mitarbeiter (41) die Addition von Ammoniak an Dihydropterin und -lumazin. Auch von Tetrahydrobiopterin ausgehend kommen sie zu den gleichen Produkten, was verständlich ist, da bei der oxydativen Abspaltung der Seitenkette (5.1) zunächst auch Dihydropterin entsteht. Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch die Addition von OH^-, SO_3H^-, CN^- (42) und von Carbanionen, die bei der Decarboxylierung von α-Ketosäuren mittels Thiaminpyrophosphat entstehen (43), an Dihydropterin.

Mit der Addition eines nucleophilen Teilchens an die 5,6-Doppelbindung von Dihydropterin wird wieder die Tetrahydrostufe erreicht. Bei der anschließenden Reoxydation des Pyrazin-Rings bleibt der neu eingetretene Substituent - zumindest teilweise - erhalten. Auch das ist zu verstehen, da, wie unter 5.2 geschildert, nach der primären Oxydation zur parachinoiden Dihydroverbindung vom C-Atom 6 ein kationisches Teilchen austreten muß. Wasserstoff, Hydroxyalkyl- und Acylreste werden deshalb eher abgespalten als z.B. $-NH_2$ oder -OH. Dies zeigen auch die beiden folgenden Beispiele.

A. Stuart und H. C. S. Wood (44) finden beim Versuch der Cyclisierung des Pyrimidinderivats I zum 7,8-Dihydroneopterin immer nur 7,8-Dihydroxanthopterin II.



Die Produkte der oxydativen Spaltung von Sepiapterin (7,8-Dihydro-6-lactyl-pterin) sind nach S. Nawa (45) - wohl nach vorheriger Wasseraddition an die 5,6-Doppelbindung - ebenfalls 7,8-Dihydroxanthopterin und Milchsäure.

Demnach erscheint eine Addition von Wasser an die 5,6-Doppelbindung des 7,8-Dihydrolumazins - evtl. unter katalytischer Wirkung von Acetat bzw. Tris aus dem Puffer - und eine nachfolgende Oxydation zum 6-Hydroxylumazin auch bei pH 7,5 durchaus möglich.

8.4 Unterscheidung zwischen nichtenzymatischer und enzymatischer Reaktion

Mit der Entdeckung der nichtkatalysierten 6-Hydroxylumazin-Bildung war die enzymatische Natur des letzten Reaktionsschritts in Frage gestellt. Dennoch gibt es eine ganze Reihe von Hinweisen auf die Existenz eines enzymatischen Weges neben dem chemischen und Möglichkeiten, zwischen beiden zu unterscheiden.

So wäre z.B. eine Abhängigkeit der Ausbeute von der Proteinkonzentration (8.22) bei einer nichtenzymatischen

Reaktion schwer verständlich. Auch die gänzlich verschiedene Form der Substratkurven (Abb. 10) ist ein brauchbares Unterscheidungsmerkmal.

Das pH-Optimum der beiden Reaktionen ist nicht identisch (Abb. 9). Diese Tatsache gibt vielleicht eine Erklärung für die 2 Gipfel der pH-Kurve beim Tetrahydroneopterin (4.34), obwohl die Maxima nicht genau übereinstimmen.

Ein weiterer, in seiner Ursache nicht geklärter Unterschied liegt in der Beeinflußbarkeit der Ausbeute durch Zugabe des löslichen Überstands von hitzedenaturiertem Leberprotein (kurz Kochüberstand genannt). Das Ergebnis solcher Versuche ist in Abb. 11 dargestellt.

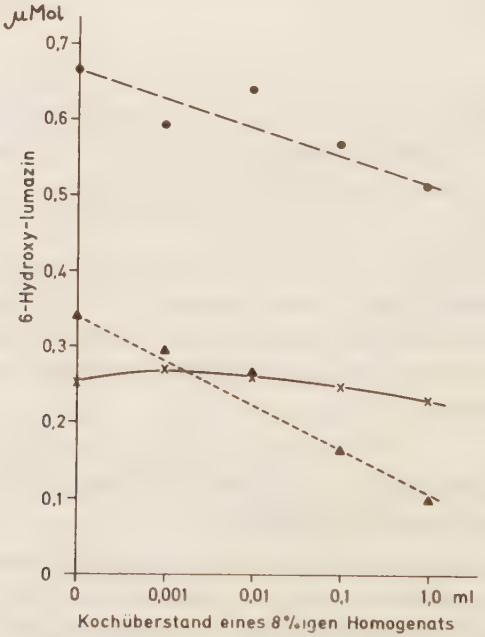


Abb. 11 Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin vom Kochüberstand für die nichtenzymatische Reaktion - - - - -, für die enzymatische Reaktion in 2% Homogenat ——— und für eine Ammonsulfatfällungs-Fraktion (30-60% Sättigung) — — — —. Jede Probe enthält 250 γ (1,5 µMol) Tetrahydrolumazin. Inkubationszeit 100 Min. Test wie unter 8.1

Die Ausbeute der nichtkatalysierten Reaktion wird durch den Kochüberstand bei weitem am stärksten gesenkt. Es ist anzunehmen, daß diese Hemmung auch im intakten Homogenat erfolgt und dort vorwiegend die enzymatische Reaktion zum Zuge kommt.

Schließlich kann eine angereicherte Enzymfraktion gewonnen werden (wie es im nächsten Abschnitt beschrieben wird), mit der man höhere Ausbeuten als bei der nichtenzymatischen Reaktion erzielt. Auch dies ist ein Beweis für die Beteiligung eines Enzyms.

9. Xanthinoxydase als beteiligtes Enzym

9.1 Anreicherungsgang

Folgender Weg hat sich zur Anreicherung der Enzymaktivität als günstig erwiesen:

Ein 8%iges Leberhomogenat (0,01m Tris-HCl, pH 7,5) wird bei 38 000 x g 10 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wird in 3 Schritten (0 - 30%, 30 - 60% und 60 - 100% Sättigung) durch Ammonsulfatfällung fraktioniert, das ausgefallene Protein bei 38 000 x g abzentrifugiert und in möglichst wenig Tris-Puffer gelöst. Die Fraktion bei 30 - 60% Sättigung enthält die höchste Aktivität. Sie wird über Nacht gegen 5 l Tris-Puffer dialysiert und dann über DEAE-Cellulose chromatographiert. Die Proteine werden mit einem Salzgradienten (0 - 0,3m NaCl in 0,01m Tris-HCl) eluiert. Von den drei bei 280 mμ absorbierenden Protein-Banden ist die zweite im Enzymtest am aktivsten. Sie wurde an DEAE-Cellulose mit einem etwas flacheren Gradienten (0 - 0,2m NaCl) rechromatographiert, wodurch eine noch feinere Auftrennung erreicht wurde. Ein scharfer Aktivitätsgipfel wird mit 0,08m NaCl von der Säule eluiert. Die Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry (46) bestimmt, die Tests in der gewohnten Weise (8.1) durch-

geführt mit 250 γ (1,5 µMol) Tetrahydrolumazin als Substrat bei 90 Min. Inkubationszeit. Die Ergebnisse der Anreicherung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3 Anreicherung der Enzymaktivität für die Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydrolumazin.

Probe	Spez. Aktivität µMol/Std. mg Protein	Anreicherung
2% Homogenat	0,022	-
Ammonsulfatfällungsfraktion 30 - 60% Sättigung	0,048	2,2-fach
1. DEAE-Chromatographie, zweite Bande	0,140	6,4 "
2. DEAE-Chromatographie Fraktion 41	1,102	50 "

Eine angereicherte Fraktion (0,35 mg Protein) wurde in einem qualitativen Test auf Xanthinoxydase-Aktivität untersucht. Die zugegebene Probe Xanthin wurde in 1 Std. praktisch quantitativ in Harnsäure umgewandelt. Die Reaktion wurde UV-spektroskopisch verfolgt.

9.2 Vergleich der beiden Enzymaktivitäten

Um zu klären, ob das gesuchte Enzym mit der Xanthinoxydase aus Rattenleber identisch ist, wurde eine Ammonsulfat-Fraktion (30 - 50% Sättigung) über DEAE-Cellulose chromatographiert. Die einzelnen Fraktionen wurden geteilt und zwei Enzymtests unterworfen:

1.) Dem gewohnten Test (8.1) zur Bildung von 6-Hydroxylumazin aus 250 γ (1,5 µMol) Tetrahydrolumazin.

2.) Einem Xanthinoxydase-Test zur Bildung von Harnsäure aus 50 γ (0,33 µMol) Xanthin in 3 ml 0,1m Tris-HCl, pH 7,5, gemessen durch die Zunahme der Absorption bei 293 mµ (Molextinktion der Harnsäure im Neutralen: $\varepsilon_{293\ m\mu}$ = 12 300).

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. 12.

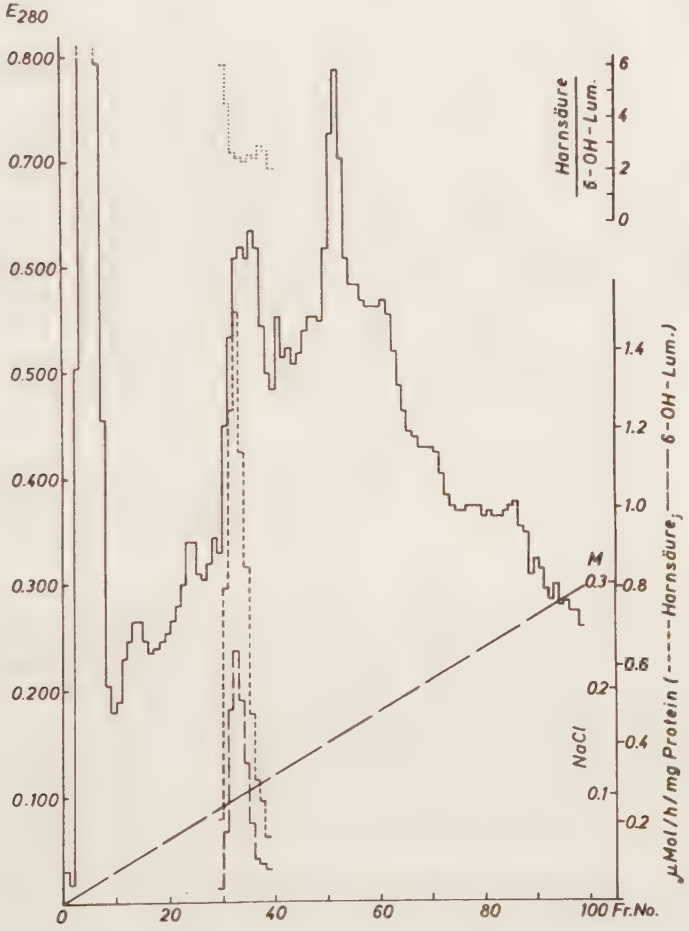
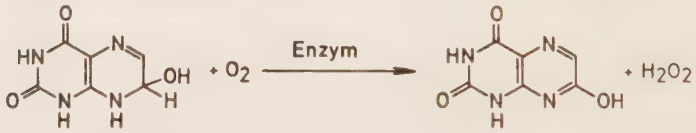


Abb. 12 DEAE-Chromatographie einer Ammonsulfatfällungs-Fraktion (30 - 50% Sättigung). Die eingezeichneten spezifischen Aktivitäten wurden mit den oben angegebenen Tests bestimmt.

Aus Abb. 12 geht hervor, daß sich die beiden Aktivitätsgipfel genau decken und daß der Quotient der beiden spezifischen Aktivitäten über den ganzen Bereich hinweg gleichbleibend ist.

Die Sauerstoff-Funktion in Stellung 6 des 6-Hydroxylumazins wird also durch die Xanthinoxydase eingeführt.

Dieser Befund ist für die Pteridin-Reihe neu. F. Bergman und H. Kwietny (47) schlossen aus Ergebnissen mit nichthydrierten Pteridinen, daß Xanthinoxydase nur in den Stellungen 2, 4 und 7 des Ringsystems angreifen kann. Die Zusammenhänge werden klarer, wenn man den Reaktionsmechanismus der Xanthinoxydase betrachtet, wie er unten für die Bildung von 7-Hydroxylumazin aus Lumazin dargestellt ist.



Das Strukturelement, an welchem die dehydrierende Reaktion der Xanthinoxydase in der Purin- und Pteridin-Reihe angreift, ist die hydratisierte Form einer C=N-Doppelbindung. Eine hohe Spezifität bezüglich der Stellung an den Ringsystemen weist das Enzym nicht auf. Fällt der Angriff auf eine Ringstellung aus, so bestimmt deshalb, weil die entsprechende C=N-Bindung nicht hydratisiert vorliegt.

Offensichtlich erfolgt bei den nichthydrierten Pteridinen die Hydratisierung der 7,8-Doppelbindung immer schneller, als diejenige der benachbarten 5,6-Doppelbindung und verhindert gleichzeitig die Hydratisierung der letzteren.

Anders liegt der Fall bei den 7,8-Dihydropteridinen. Wie unter 8.3 ausführlich besprochen, ist eine Hydratisierung der 5,6-Doppelbindung beim 7,8-Dihydrolumazin durchaus möglich und es ist damit ein Substrat für die Xanthinoxydase

gegeben. Den normalen Mechanismus des Enzyms vorausgesetzt, müßte als Produkt der Reaktion ein 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin (XIII) entstehen (bezüglich dieser Struktur siehe 10.3 und Formelschema), welches dann durch Aufkochen und Stehen an der Luft (8.1) zu 6-Hydroxylumazin oxydiert wird.

9.3 Test mit Xanthinoxydase aus Milch

Xanthinoxydase aus Milch ist als reines Präparat erhältlich. Es wurden 500 γ dieses Enzyms mit 250 γ Tetrahydrolumazin in der üblichen Weise getestet. Die gemessene spezifische Aktivität für die Bildung von 6-Hydroxylumazin betrug 0,87 µMol/h x mg Protein.

9.4 Ablauf der Gesamtreaktion mit zwei Enzymen

Nach den bisherigen Befunden sollte die Gesamtreaktion ausgehend von Tetrahydroneopterin bis zum 6-Hydroxylumazin unter Beteiligung von nur 2 Enzymen (Pterindesaminase und Xanthinoxydase) ablaufen können.

Pterindesaminase läßt sich in angereicherter Form (38) aus Rattenleber gewinnen. Eine Ammonsulfatfällungs-Fraktion von 50 - 60% Sättigung wurde über Nacht gegen 5 l Tris-Puffer pH 7,5 dialysiert, dann für 5 Min. auf 60° erwärmt und anschließend sofort abgeschreckt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand als Pterindesaminase-Fraktion (4,75 mg Protein/ml) verwendet. Xanthinoxydase aus Milch wurde als reines Präparat eingesetzt.

In einem qualitativen Vorversuch wurden 1,7 mg (2-^{14}C)Tetrahydropterin mit Pterindesaminase (23,8 mg Protein) und Xanthinoxydase (2 mg) 2 Stdn. lang inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich (4.1). Von der wiedergewonnenen Radioaktivität waren 25% in Isoxanthopterin und 50% in 6,7-Dihydroxylumazin enthalten. Während der langen Inkubationszeit war offensichtlich die Oxydation zum 6-Hydroxylumazin (XIV) schon abgelaufen und dieses wurde durch Xanthinoxydase weiter umgesetzt zum 6,7-Dihydroxylumazin (XVIII) (siehe auch 29 und Formelschema).

Beim entsprechenden Versuch mit Tetrahydroneopterin wurde gleichzeitig eine Zeitkurve gemessen. In einem Inkubationsmedium, enthaltend 23,8 mg der Pterindesaminase-Fraktion und 1 mg Xanthinoxydase in 16 ml 0,1m Tris-HCl, pH 7,5, wurden 2 mg (2-^{14}C)Tetrahydroneopterin inkubiert. Zu entsprechenden Zeiten wurden 2 ml-Proben entnommen und nach dem Testverfahren (4.1) aufgearbeitet. Das Resultat gibt Abb. 13 wieder.

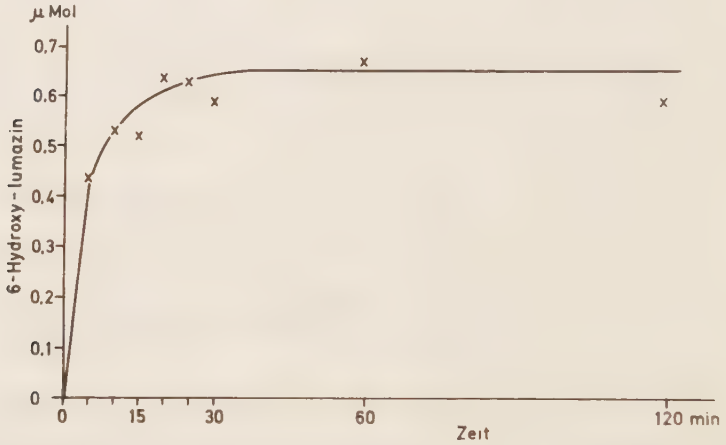


Abb. 13 Zeitkurve für die Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydroneopterin mit Pterindesaminase und Xanthinoxydase. Jede Probe enthält 250 γ (1,0 µMol) (2-^{14}C)Tetrahydroneopterin. Test wie unter 4.1

Mit diesen Versuchen ist gezeigt, daß in die Gesamtreaktion vom Tetrahydroneopterin bis zum 6-Hydroxylumazin nur zwei enzymatische Schritte eingebaut sind. Alle übrigen Schritte sind nichtenzymatischer Natur.

10. Spektroskopische Untersuchung der Reaktion.

Die Struktur des enzymatischen Produkts

10.1 UV-spektroskopische Verfolgung der enzymatischen Reaktion

Durch die unter 9.1 geschilderte Anreicherung war es nun möglich, zu aktiven Enzymfraktionen von relativ geringer Proteinkonzentration zu gelangen und damit die enzymatische Reaktion UV-spektroskopisch zu verfolgen. Besonders übersichtlich ist die Veränderung der Spektren im Sauren.

Einem normalen enzymatischen Inkubationsansatz mit 50 γ Tetrahydrolumazin pro ml wurden zu den angegebenen Zeiten 2 ml-Proben entnommen. Diese wurden mit 1 ml 1n HCl angesäuert und ihre Spektren aufgenommen (Abb. 14/1).

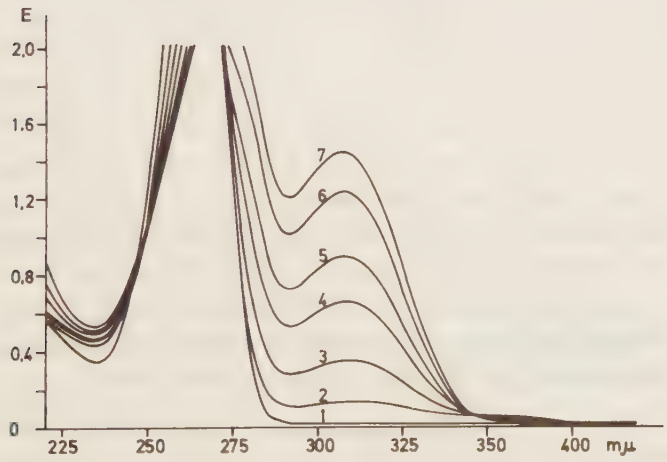


Abb. 14/1

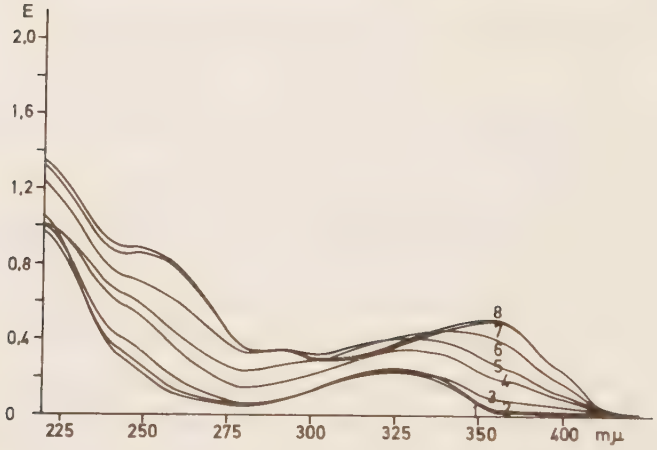


Abb. 14/2

Abb. 14 UV-Spektren in 0,33n HCl von Proben aus einem enzymatischen Ansatz mit Tetrahydrolumazin, entnommen nach 0 Min. (1); 15 Min. (2); 30 Min. (3); 45 Min. (4); 60 Min. (5); 90 Min. (6); 120 Min. (7). Abb. 14/1: unmittelbar nach Entnahme; Abb. 14/2: nach 24 Stdn. an Luft.

Probe 1 - beim Start der Reaktion entnommen - zeigt das Spektrum des Tetrahydrolumazins mit λ_{max} = 265 mμ. Im Laufe von 2 Stdn. entwickelt sich das Spektrum des enzymatischen Produkts (Probe 7) mit λ_{max} = 269 mμ und 308 mμ. Beim Aufoxydieren der Proben an Luft ergibt sich ein Gemisch aus Lumazin (λ_{max} = 325 mμ) und 6-Hydroxylumazin (λ_{max} = 365 mμ), dessen Gehalt an letzterem der vorher vorhandenen Menge des Enzymprodukts (λ_{max} = 308 mμ) entspricht.

Das Spektrum des Enzymprodukts zeigt eine weitere Eigenheit. Es verändert sich innerhalb eines weiten pH-Bereichs fast überhaupt nicht (Abb. 15).

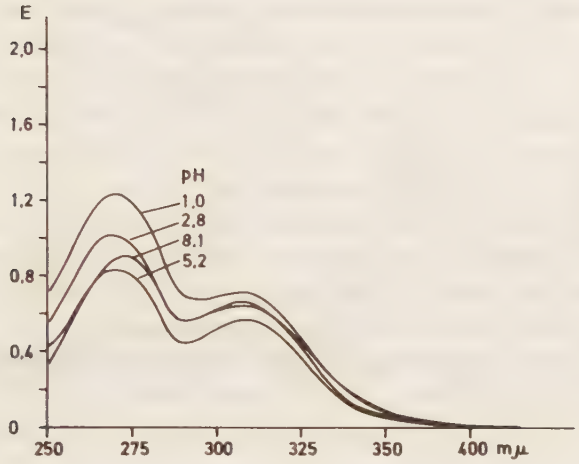


Abb. 15 UV-Spektren des Enzymprodukts

Zwischen pH 1 und 8,1 verschiebt sich das kürzerwellige Maximum nur um 5 mμ, das längerwellige um 2 mμ nach längeren Wellen.

10.2 UV-spektroskopische Verfolgung der nichtenzymatischen Reaktion

Einem Inkubationsansatz von Tetrahydrolumazin in Tris-Puffer, pH 7,5, wurden zu den angegebenen Zeiten je zwei 2 ml-Proben entnommen und mit 1 ml 1n HCl bzw. 1 ml 1n NaOH versetzt (Abb. 16).

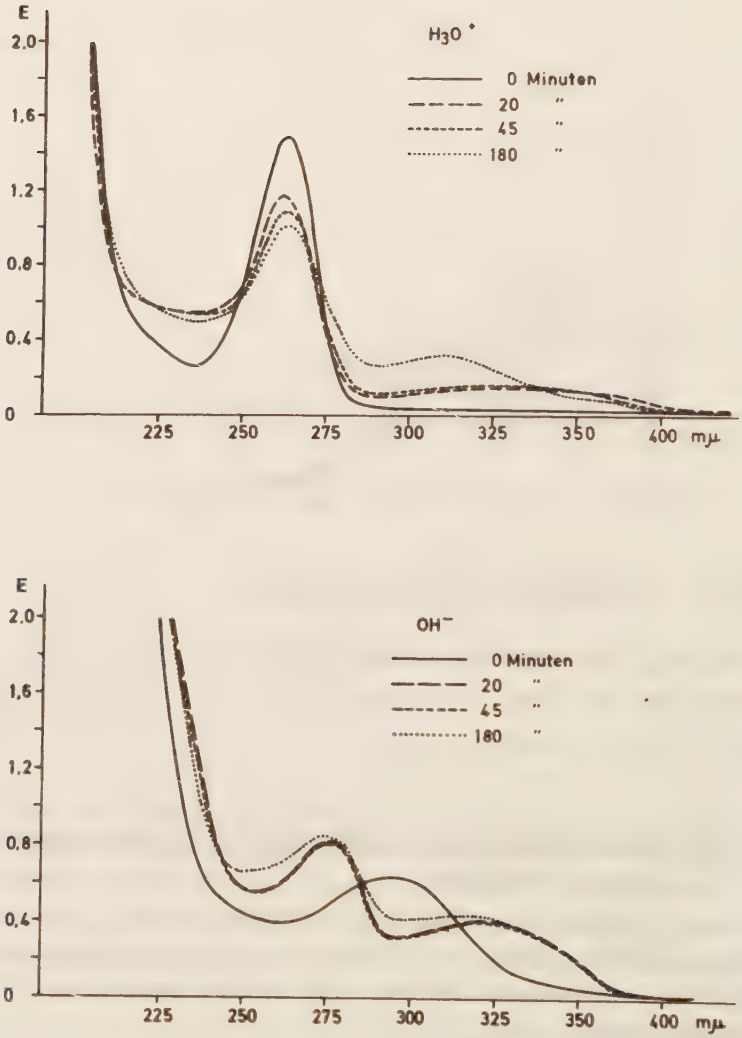


Abb. 16 UV-Spektren von Proben aus einem Oxydationsansatz mit Tetrahydrolumazin. Oben: in 0,33n HCl. Unten: in 0,33n NaOH.

Die Veränderungen der Spektren sind weit weniger übersichtlich, als im Falle der enzymatischen Reaktion. Ausgehend vom Spektrum des Tetrahydrolumazins (Probe 1) wird nach 3 1/2 Stdn. Inkubation ein Spektrum erreicht, das dem in Abb. 15 gezeigten sehr ähnlich, aber doch nicht gleich ist. Vor allem die bathochromen Verschiebungen der beiden Maxima vom Sauren zum Alkalischen sind mit jeweils etwa 10 mμ größer. Nach Untersuchungen von W. Pfleiderer (48) über durch Methylgruppen blockierte 7,8-Dihydropterine zeigen diese eine charakteristische bathochrome Verschiebung der längerwelligen Absorptionsbande beim Übergang vom Neutralen ins Saure. Die flache Schulter bei etwa 360 mμ in den sauren Spektren von Abb. 16 könnte evtl. so gedeutet werden. Doch stammen diese Spektren wohl nicht von reinen Substanzen, sondern von Gemischen.

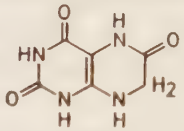
10.3 Struktur des enzymatischen Produkts

Schon im Abschnitt 9.2 wurde die Vermutung geäußert, das Enzym-Produkt müsse bei normalem Mechanismus der Xanthinoxydase die Struktur eines 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazins haben. Das unter 10.1 besprochene UV-Spektrum liefert eine starke Stütze für diese Annahme. 7,8-Dihydroxanthopterin, die analoge Verbindung aus der Pterinreihe, (synthetisiert nach 49) zeigt ebenfalls eine nur geringe Verschiebung der UV-Maxima beim Übergang von niedrigen zu hohen pH-Werten.

Um die Struktur des Zwischenprodukts noch weiter abzusichern, wurden entsprechend obiger Vorschrift (49) 320 γ 6,7-Dihydroxylumazin in 10 ml 0,1n NaOH gelöst und mit etwa 15 g eines 3%igen Natriumamalgams reduziert. Schon nach 10-minütiger Reaktion zeigte die Reduktionslösung im Sauren und Alkalischen das UV-Spektrum des Enzymprodukts (Abb. 15).

Damit dürfte die Struktur der Verbindung feststehen. Die Eigenschaften der UV-Spektren lassen sich am besten verstehen, wenn man annimmt, daß die Hydroxylgruppe in Stel-

lung 6 in der tautomeren Lactamform vorliegt. Die genaue Struktur des Enzymprodukts wäre demnach die eines 2,4,6-Trioxo-octahydro-pteridins.+



10.4 Analoge Verhältnisse in der Pterin-Reihe

Schon bei der Diskussion der nichtkatalysierten Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydrolumazin wurden Beispiele auch aus der Pterin-Reihe herangezogen. Es sollte also eine analoge Reaktionsfolge auch in der Pterin-Reihe möglich sein: Vom Tetrahydropterin (V) oder -neopterin (I) zum 7,8-Dihydropterin (VIa), von dessen hydratisierter Form zum 7,8-Dihydroxanthopterin (VIII) (in biologischen Ansätzen evtl. auch hier unter Beteiligung von Xanthinoxydase) und schließlich zum Xanthopterin (IX) (siehe Formelschema).

Die Verhältnisse in der Lumazin-Reihe sind deshalb leichter überschaubar, weil 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin beim Stehen an Luft oder beim Versuch einer Isolierung in kurzer Zeit quantitativ zu 6-Hydroxylumazin oxydiert wird. Die analoge Verbindung der Pterin-Reihe, das 7,8-Dihydroxanthopterin, wird nur langsam zu Xanthopterin oxydiert und man isoliert meist chromatographisch schwer trennbare Gemische beider Substanzen.

Beim Abbau von Tetrahydrobiopterin, -neopterin und -pterin in Homogenaten und auch in Kontrollansätzen mit denaturiertem Protein oder in reinem Puffer taucht 7,8-Dihydroxanthopterin unter den Produkten auf (Abschn. 4.31 und 6). Von H. Metzger wurde es erstmals unter den Abbauprodukten von Tetrahydrobiopterin nachgewiesen und charakterisiert (39). Nach seinen Untersuchungen besitzt es das

---

+ Für die Diskussion der UV-Spektren danke ich Herrn Dr. H. Gross.

gleiche UV-Spektrum, wie authentisches 7,8-Dihydroxanthopterin, welches nach A. Albert (49) synthetisiert wurde, und in vier papierchromatographischen Systemen fast identische R_f-Werte mit Xanthopterin.

Um das Ausmaß dieser Reaktionsfolge und eine eventuelle Beteiligung der Xanthinoxydase zu untersuchen, wurden einmal in 12 ml Tris-Puffer mit 3 mg Xanthinoxydase (Probe N) und dann in 12 ml reinem Puffer (Probe C) je 1,05 mg (29 500 Imp/Min) (2-^{14}C)Tetrahydroneopterin 2 Stdn. lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufkochen der Lösung gestoppt. Beide Proben wurden je einmal über Dowex 1X8 und zweimal über P-Cellulose chromatographiert. Die Ausbeuten in % der wiedergewonnenen Radioaktivität zeigt die folgende Aufstellung:

Probe N		Probe C	
Isoxanthopterin	19,5%	Unbekannte, nicht fluoreszierende Substanz	13,0%
Xanthopterin + Dihydroxanthopterin	80,5%	Pterin	32,4%
		Xanthopterin + Dihydroxanthopterin	51,5%

Daß die genannten Fraktionen tatsächlich Gemische aus Xanthopterin und Dihydroxanthopterin sind, zeigen ihre UV-Spektren (Abb. 17).

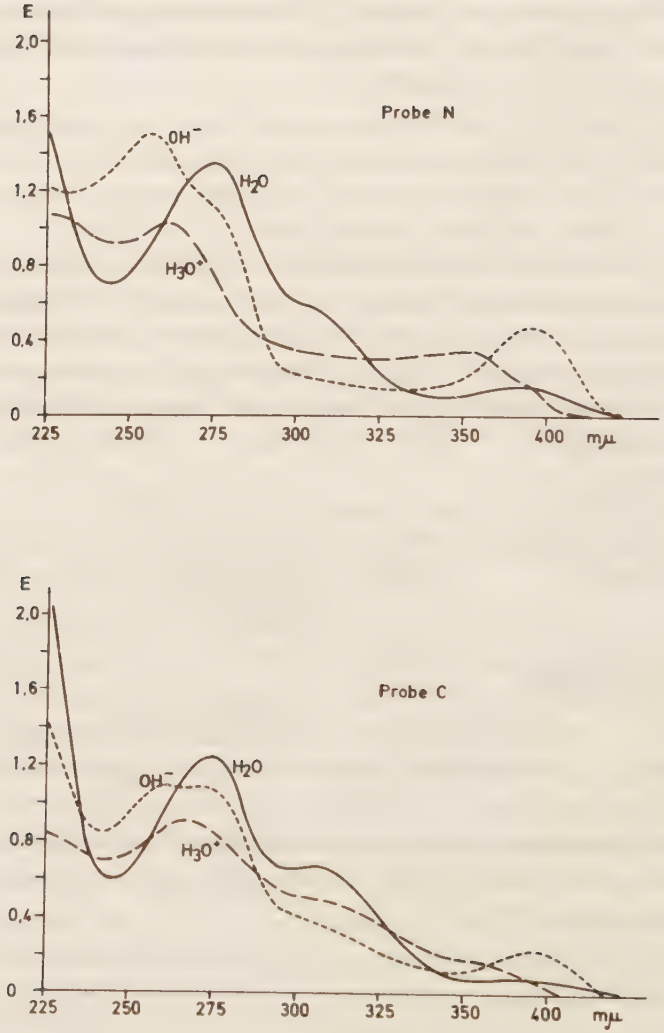


Abb. 17 UV-Spektren von Gemischen aus Xanthopterin und 7,8-Dihydroxanthopterin im Sauren — — — —; im Neutralen ———— und im Alkalischen - - - - - - - -.

Zum Vergleich werden hier die UV-Maxima von reinem Xanthopterin und reinem 7,8-Dihydroxanthopterin angegeben:

λ_{max} (mμ) Xanthopterin			λ_{max} (mμ) 7,8-Dihydroxanthopterin		
H_3O^+	H_2O	OH^-	H_3O^+	H_2O	OH^-
268	275	255	275	273	275
356	(308)	395	306	310	(310)
	380				

Ein ganz analoger Versuch mit Tetrahydrofolsäure zeigt, daß auch hier der gleiche Abbauweg beschritten wird. Je 4,3 mg (9,7 μMol) Tetrahydrofolsäure wurden in 10 ml Tris-Puffer einmal mit 3 mg Xanthinoxydase (Probe N) und einmal ohne Enzym (Probe C) inkubiert. Nach 1/2-stündiger Inkubation und der üblichen Aufarbeitung bringt Probe N eine Ausbeute an Xanthopterin + Dihydroxanthopterin von 4,27 μMol = 43,9% (auf optischem Wege bestimmt). In Probe C beträgt die Ausbeute auch nach 2-stündiger Inkubation nur 1,94 μMol = 20%. Dieser letzte Befund bestätigt ein Ergebnis von R. L. Blakley (50), der nach Oxydation von Tetrahydrofolsäure an Luft 17% Xanthopterin findet.

Aus diesen beiden Versuchen folgt:

Bei Abwesenheit der Pterindesaminase ist dieser Reaktionsweg über 7,8-Dihydropterin (VI) zum 7,8-Dihydroxanthopterin (VIII) am Abbau von Tetrahydrofolsäure und Tetrahydroneopterin wesentlich beteiligt (siehe Formelschema).

Eine Oxydation bis zum Xanthopterin ist bei den verwendeten Inkubations- und Aufarbeitungsbedingungen möglich.

Die Verhältnisse sind denen in der Lumazin-Reihe sehr ähnlich. In beiden Fällen sind die Reaktionsmechanismen die gleichen und es existieren nebeneinander ein enzymatischer und ein nichtenzymatischer Reaktionsschritt, die beide in unterschiedlicher Ausbeute zum gleichen Produkt führen.

Eine Beteiligung der Xanthinoxydase ist in beiden Fällen gesichert, wenn auch der Anteil der nichtkatalysierten Reaktion am Gesamtumsatz hier wesentlich höher liegt als in der Lumazin-Reihe.

11. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse gestatten es nun, den gesamten oxydativen Abbau des Tetrahydroneopterins (I) in einem Schema darzustellen (siehe Anhang).

Nach Untersuchungen von S. Kaufman über die enzymatische (51) und von M. Viscontini über die chemische Oxydation (52) von Tetrahydropterinen tritt als erstes Oxydationsprodukt ein Dihydropterin mit parachinoider Struktur auf (I ⟶ II). Dieses ist sehr instabil und lagert sich durch Tautomerisierung rasch in das stabilere 7,8-Dihydroderivat um.

Beim parachinoiden Dihydroneopterin (II) kann diese Tautomerisierung - durch Wanderung eines positiven Restes - nun auf zweierlei Art erfolgen: Durch Wanderung des Protons aus Stellung 6 gelangt man zum 7,8-Dihydroneopterin (III), welches nach weiterer Oxydation Neopterin (IV) liefert. Ob man III aus den Ansätzen isolieren kann, ist fraglich. H. Metzger (29) beschrieb, ausgehend von Tetrahydrobiopterin, eine Substanz G, der er auf Grund ihres UV-Spektrums die Struktur eines 7,8-Dihydrobiopterins zuschrieb. Nach den spektralen Kriterien von W. Pfleiderer (48) ist dieser Strukturvorschlag aber weniger wahrscheinlich.

Analog der Reoxydation von Tetrahydroneopterin zum Neopterin (I ⟶ II ⟶ III ⟶ IV) verläuft wohl auch die Reoxydation von Tetrahydropterin zum Pterin (V ⟶ VIc ⟶ VIa ⟶ VII) und von Tetrahydrolumazin zum Lumazin (X ⟶ XIc ⟶ XIa ⟶ XII).

Die zweite Möglichkeit der Tautomerisierung von II liegt in der Abspaltung der Polyhydroxyalkyl-Seitenkette als positiver Rest. Sie stabilisiert sich durch Abspaltung eines Protons rasch zum Glycerinaldehyd, welcher abgefangen und nachgewiesen werden kann. Diese Umlagerung - die im strengen Sinne keine Tautomerisierung mehr ist - führt also vom parachinoiden Dihydroneopterin zum 7,8-Dihydropterin (VIa).

Dieses 7,8-Dihydropterin, welches auch aus Tetrahydropterin (V) durch Oxydation entsteht, steht im Gleichgewicht mit seiner hydratisierten Form (VIb). Weitere chemische Oxydation von VIb führt über Dihydroxanthopterin (VIII) zu Xanthopterin (IX). VIb ist aber andererseits ein typisches Substrat der Xanthinoxydase. Folglich steigt bei Anwesenheit dieses Enzyms die Ausbeute an VIII. Die nichtenzymatische und enzymatische Reaktion laufen nebeneinander her. Auch von Tetrahydrofolsäure ausgehend gelangt man durch Oxydation und Abspaltung der Seitenkette (als Formaldehyd + p-Aminobenzoylglutaminsäure) zu VIa. Die weiteren Schritte bis zum Xanthopterin erfolgen gemäß dem Schema.

Das Auftreten von Xanthopterin in biologischem Material (z.B. Insekten (7) oder menschlichem Harn, (53,54)) könnte somit auf zweierlei Weise erklärt werden. Entweder liegen ursprünglich Tetrahydrofolsäure oder Tetrahydrobiopterin vor, welche bei der Aufarbeitung auf chemischem Weg - nach dem Schema - in Xanthopterin umgewandelt werden, oder der Abbau erfolgt unter Beteiligung der Xanthinoxydase schon im Organismus bis zum Dihydroxanthopterin (VIII), welches dann ausgeschieden und als solches oder als Xanthopterin isoliert wird.

Bei Abwesenheit eines desaminierenden Enzyms - also bei Oxydationsansätzen in Puffer oder bei Einsatz reiner Xanthinoxydase - wird nur der obere Teil des Reaktionsschemas durchlaufen. Im Gesamthomogenat oder bei Zusatz einer Desaminase-Fraktion gelangt man von der Pterin- in die Lumazin-Reihe. Hier laufen dann die ganz analogen Reaktionsschritte ab. Das

gleiche gilt für Tetrahydrolumazin als Substrat. Die Beteiligung der Xanthinoxydase an der Oxydation von 7,8-Dihydrolumazin-Hydrat (XIb) zu 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin (XIII) ist noch größer als bei der Oxydation von VIb zu VIII. Die Luftoxydation von XIII zu 6-Hydroxylumazin (XIV) verläuft wesentlich rascher als die von VIII zu IX.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht nicht mit genügender Klarheit hervor, ob im gesamten Reaktionsablauf die Xanthinoxydase-Reaktion oder einer der vorgelagerten Reaktionsschritte geschwindigkeitsbestimmend sind (dies sind bei Tetrahydrolumazin als Substrat Oxydation, Tautomerisierung und Hydratisierung der C=N-Doppelbindung, bei Tetrahydroneopterin Oxydation, Abspaltung der Seitenkette, Desaminierung und Hydratisierung). Es wurde deshalb darauf verzichtet, aus der Substratkurve (Abb. 10) einen K_m-Wert für die Xanthinoxydase-Reaktion zu bestimmen.

In das Reaktionsschema aufgenommen sind ferner die Folgeprodukte der Einwirkung von Xanthinoxydase auf nichthydrierte Pteridine. Sie können entstehen, wenn nicht vollständig hydrierte Substanzen als Substrate angeboten werden oder wenn schon während der Inkubationszeit eine vollständige Reoxydation zum nichthydrierten Pteridin stattgefunden hat. So wandelt Xanthinoxydase Pterin (V), Xanthopterin (IX), Lumazin (X) und 6-Hydroxylumazin (XIV) in Isoxanthopterin (XV), Leucopterin (XVI), 7-Hydroxylumazin (XVII) bzw. 6,7-Dihydroxylumazin (XVIII) um.

Damit ist die Herkunft sämtlicher wichtiger Metabolite bei in-vitro-Ansätzen mit Tetrahydroneopterin (bzw. Tetrahydrobiopterin) als Substrat erklärt. Auch der hohe Sauerstoffbedarf der Gesamtreaktion wird verständlich. Nur zwei Enzyme treten in dem Reaktionsschema auf: Pterindesaminase ist zur Einführung der Sauerstoff-Funktion in Stellung 2 unbedingt erforderlich. In die Stellungen 6 und 7 werden Sauerstoff-Funktionen durch Xanthinoxydase eingeführt, wobei die Reaktion in Stellung 6 auch auf nichtenzymatischem Wege erfolgen kann.

Tetrahydrierte Cofaktoren zeigen also unter aeroben Bedingungen eine beträchtliche Labilität und es ist beim Arbeiten mit ihnen gefährlich, lediglich aus dem Auftreten von Metaboliten biochemische Rückschlüsse über ihre Funktion zu ziehen.

Welche Teile dieses in-vitro-Abbauschemas in vivo von Bedeutung sind, müssen weitere Versuche klären.

12. Zusammenfassung

Neopterin wurde nach der von H. Rembold und H. Metzger angegebenen Methode synthetisiert und gereinigt. Der Einfluß der molaren Verhältnisse der Reaktionspartner auf die Neopterin-Ausbeute wurde studiert. Nach der gleichen Vorschrift wurde radioaktives (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin hergestellt.

Die Methoden der Hydrierung von Pteridinen werden besprochen, eine Kinetik der katalytischen Hydrierung von Neopterin gemessen und die UV-Spektren der Tetrahydropteridine diskutiert.

Die Gesamtreaktion des Abbaues von Tetrahydroneopterin zu 6-Hydroxylumazin in Rattenleberhomogenaten wird charakterisiert. Sie weist keine hohe Spezifität bezüglich des Substituenten in Stellung 6 des Tetrahydropterins auf. Die Abhängigkeit der Ausbeute an 6-Hydroxylumazin von der Zeit, der Homogenatkonzentration, der Substratmenge und vom pH wird bestimmt. Die Hemmbarkeit der Reaktion wird untersucht.

Es wird bewiesen, daß die Abspaltung der Seitenkette des Tetrahydroneopterins eine nichtenzymatische Reaktion ist. Die Seitenkette wird als Glycerinaldehyd abgefangen und nachgewiesen. Durch aerobe und anaerobe Inkubationen sowie durch Austauschversuche zwischen radioaktiver Seitenkette

und Glycerinaldehyd wird gezeigt, daß die Abspaltung an einen oxydativen Prozeß gekoppelt ist und irreversibel verläuft.

Die Bildung von 6-Hydroxylumazin aus Tetrahydropterin in Leberhomogenat wird in ihrer Abhängigkeit von der Zeit und von der Homogenatkonzentration untersucht.

Die Bedeutung der enzymatischen Desaminierung von Pterin für den gesamten Reaktionsablauf wird kurz diskutiert.

Auch aus Tetrahydrolumazin bildet sich im Leberhomogenat 6-Hydroxylumazin, für welches sich bei dieser Reaktion eine optische Bestimmungsmethode ausarbeiten läßt. Die Abhängigkeit der Ausbeute von der Zeit, der Homogenatkonzentration, dem pH und der Substratkonzentration wird bestimmt. Anhand dieser Kurven werden einige Merkmale der entsprechenden Kinetik für das Tetrahydroneopterin erklärt.

Auch auf nichtenzymatischem Wege kann aus Tetrahydrolumazin 6-Hydroxylumazin entstehen. Ersteres wird durch Luftsauerstoff zu 7,8-Dihydrolumazin oxydiert, welches an der 5,6-Doppelbindung Wasser addiert. Erneute Oxydation führt über 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin zum 6-Hydroxylumazin.

Möglichkeiten zur Unterscheidung zwischen enzymatischer und nichtkatalysierter Reaktion werden angegeben. Die Enzymaktivität des Homogenates läßt sich durch Ammonsulfatfällung und DEAE-Chromatographie 50-fach anreichern. Eine vergleichende Anreicherung beweist, daß das Enzym mit der Xanthinoxydase aus Rattenleber identisch ist. Auch Xanthinoxydase aus Milch katalysiert die Reaktion. Ein Angriff der Xanthinoxydase auf Stellung 6 des Pteridin-Rings ist bisher - an nichthydrierten Pteridinen - nicht beobachtet worden. Die Hydratisierung der 5,6-Doppelbindung des 7,8-Dihydrolumazins liefert aber ein typisches Substrat für das Enzym. Der gesamte Abbau des Tetrahydroneopterins zum 6-Hydroxylumazin läuft unter Beteiligung von 2 Enzymen ab, der Pterin-Desaminase und der Xanthinoxydase.

Durch UV-spektroskopische Verfolgung der Reaktion und durch unabhängige Synthese wurde die Struktur des enzymatischen Produkts gesichert. Es ist 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin in der tautomeren Form eines 2,4,6-Trioxo-octahydropteridins. Beim Stehen an Luft oxydiert es sich leicht zu 6-Hydroxylumazin.

In der Pterin-Reihe wird bei Abwesenheit der Pterin-Desaminase ein der Lumazin-Reihe analoger Reaktionsweg über folgende Stufen beschritten: Tetrahydrofolsäure, Tetrahydroneopterin oder Tetrahydropterin ⟶ 7,8-Dihydropterin (hydratisiert) ⟶ 7,8-Dihydroxanthopterin ⟶ Xanthopterin. Auch hier sind nebeneinander ein nichtenzymatischer und ein enzymatischer (Xanthinoxydase) Reaktionsweg gegeben.

Der gesamte Abbauweg wird in einem übersichtlichen Schema zusammengefaßt, das die Herkunft der wichtigsten Metabolite erklärt, die in in-vitro-Ansätzen mit Tetrahydroneopterin auftreten.

13. Experimenteller Teil

13.1 Chromatographische Methoden

Verwendete Ionenaustauscher:

Dowex 1X8 (Dow Chemical Company), ein starker Anionenaustauscher, 200 - 400 mesh, Gegenion Cl^-

Ecteola-Cellulose (Serva), ein schwacher Anionenaustauscher

Phosphor-Cellulose (Serva), ein schwacher Kationenaustauscher

DEAE-Cellulose (Serva), ein schwacher Anionenaustauscher

Präparation der Säulen:

Dowex 1X8 wurde nach der Vorschrift von L. Buschmann (37) regeneriert. Es wurden meist Säulen von 3 ml Volumen verwendet.

Präparation und Regenerierung der P-Cellulose- und Ecteola-Cellulose-Säulen erfolgte nach der Vorschrift von H. Rembold und H. Metzger (31). Je nach Verwendungszweck wurden Säulen von 10 - 200 ml Volumen bereitet.

Die DEAE-Säule (28 ml Volumen) wurde regeneriert mit je 1/2 Säulenvolumen 1%iger NaOH und 1%iger HCl. Anschließend wurde die Säule mit Wasser neutral gewaschen und mit dem gleichen Puffer äquilibriert, in welchem das zu chromatographierende Proteingemisch aufgetragen wird.

Chromatographie:

Auf Dowex 1X8, Ecteola- und P-Cellulose wurden die zu trennenden Substanzen in wässriger Lösung aufgetragen und einsickern gelassen. Die Durchspülung der Säulen mit Elutionsmitteln aus einem Vorratsgefäß erfolgte entweder durch hydrostatischen Druck, wobei die Fraktionen mittels eines Siphons und eines Fraktionssammlers aufgefangen wurden, oder durch regelmäßig laufende peristaltische Pumpen in Verbindung mit einer Schaltuhr am Fraktionssammler. Je nach gewünschter Trennschärfe wurden Fraktionen von 3 - 20 ml geschnitten.

Als Elutionsmittel dienten bei Dowex 1X8 Wasser für neutrale, 0,1%ige Ameisensäure für schwach saure und 5%ige Ameisensäure für stärker saure Stoffe; bei P-Cellulose Wasser für neutrale und 5%ige Ameisensäure für basische Substanzen.

Papierchromatographie:

Vergleichende Papierchromatographie wurde aufsteigend auf Papierstreifen (Schleicher und Schüll, Sorte 2043 b) vorgenommen. Als Laufmittel wurden verwendet:

a n-Butanol/Eisessig/Wasser (20:3:7)
b 3%ige wässr. Ammonchloridlösung
c 4%ige wässr. Natriumcitratlösung
d n-Propanol/1%iger wässr. Ammoniak (2:1)

Präparativ-papierchromatographische Trennungen erfolgten auf großen Bögen des gleichen Papiers absteigend mit einem der 4 Systeme.

Pterine werden auf dem Papier durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe (Wellenlänge 254 mμ oder 350 mμ) als fluoreszierende Flecken erkannt.

13.2 Präparative Methoden

Zur Herstellung von 3%igem Natriumamalgam wurde die entsprechende Menge Quecksilber in eine Porzellanschale eingewogen. 3% des Gewichts an Natrium wurde in kleine Stücke aufgeschnitten, welche hinter einer Schutzscheibe an der Spitze eines langen Glasstabes in das Quecksilber eingetaucht wurden. Die Verbindung der beiden Metalle erfolgt unter Flammenerscheinung.

Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Glycerinaldehyds wurde dargestellt durch Zugabe einer äquimolaren Menge von 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 2n HCl, zur wässrigen Lösung des Aldehyds. Nach 30 Min. Stehen bei 0° kristallisiert das Derivat aus. Nach Absaugen und Waschen mit verd. HCl und Wasser wurde die Substanz aus 50% Methanol umkristallisiert.

Zur Darstellung des Glycerin-tribenzoats wurde von der wässrigen Glycerin-Lösung im Rotationsverdampfer das Wasser abgetrennt. Das Glycerin wurde mit 3 Äquivalenten Benzoylchlorid, gelöst in 5 Äquivalenten Pyridin, versetzt. Das farblose Derivat bildet sich sofort. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 5%iger Natriumcarbonat-Lösung gewaschen und aus Methanol umkristallisiert.

Konzentrationen von Mutterlaugen und Lösungen beider Derivate wurden auf optischem Wege bestimmt:
Glycerinaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon: $\varepsilon_{359\ m\mu} = 22\ 174$
Glycerin-tribenzoat: $\varepsilon_{272\ m\mu} = 2\ 670$

2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin (THP) wurde nach C. K. Cain et al (55) synthetisiert.

Synthese, Reinigung und Ausbeutebestimmung von unmarkiertem Neopterin sowie von (6,7,1',2',3'-^{14}C)Neopterin und des isomeren 7-Neopterins erfolgten - mit Ausnahme der unter

2.1 besprochenen Modifikationen - nach der Vorschrift von H. Rembold und H. Metzger (31).

(2-^{14}C)Pterin wurde dargestellt durch Kondensation von (2-^{14}C)THP mit einem geringen Überschuß an Glyoxal in verdünnter Essigsäure durch eintägiges Stehen bei Raumtemperatur. Es wurde durch Chromatographie über P-Cellulose gereinigt.

Die Synthese von (2-^{14}C)6-Hydroxymethylpterin geht aus von (2-^{14}C)6-(L-erythro-1,2,3-Trihydroxypropyl)-pterin. Dieses wird mit Natriumperjodat in wässriger Lösung zum Pterin-6-aldehyd gespalten, welcher nach Reinigung über P-Cellulose mit Natriumboranat in wässriger Lösung zum 6-Hydroxymethylpterin reduziert wird. Eine Reinigung des Produkts über P-Cellulose schließt sich an.

(6,7,1'-^{14}C)Pterin-6-carbonsäure wurde durch Permanganatoxydation (13.4) von (U-^{14}C)Neopterin gewonnen.

13.3 Hydrierung von Pteridinen

Der verwendete Katalysator, PdO, wurde nach einer Vorschrift von C. Weygand (56) hergestellt. Anfangs wurden 30 mg PdO pro Hydrieransatz genommen, später nur noch 1 - 5 mg. Diese Menge genügt bei den geringen Konzentrationen an Pteridinen ebenso und die Absorption des hydrierten Materials am Katalysator wird geringer. Diese Absorption läßt sich bei radioaktiven Substanzen leicht bestimmen durch Messung der Zählausbeute vor und nach der Hydrierung; doch ist hierbei darauf zu achten, daß die Hydrierlösung verdünnt wird, da sonst durch ihren hohen Salzgehalt bei der Bestimmung der Radioaktivität ein zu hoher Verlust vorgetäuscht wird. Außer im Falle des Pterins waren diese Verluste aber nicht hoch.

Zwei Methoden zur Hydrierung in der angegebenen Apparatur (36) wurden angewandt:

Bei der ersten wird unter strömendem Stickstoff eine bestimmte Menge 0,2n HCl und das abgewogene PdO in die Apparatur gebracht. Nach Anschließen an die Hydriervorrichtung wird der Katalysator 20 Min. mit Wasserstoff gesättigt. Nun wird unter strömendem Wasserstoff das gleiche Volumen einer wässrigen Lösung des Pteridins zupipettiert und 1 Std. lang hydriert. Durch Zugabe von festem Tris (36 mg pro ml 0,2n HCl) wird die Lösung auf etwa pH 7,5 abgepuffert. Unter strömendem Stickstoff wird der Katalysator abfiltriert und die Probe zur Inkubation entnommen.

Die zweite Methode eignet sich besser für in Wasser schwer lösliche Pteridine, wie Pterin und Lumazin. Das Vorhydrieren des Katalysators erfolgt wie oben, jedoch in 1n HCl. Das Pteridin wird gelöst im halben Volumen 1n NaOH zugegeben. Es fällt dabei nicht aus. Nach 1 Std. Hydrieren wird die Lösung mit einem weiteren halben Volumen 1n NaOH neutralisiert. Nach dem Abfiltrieren des PdO empfiehlt sich hier eine Nachprüfung des pH mit Indikatorpapier.

Die verwendete Apparatur erlaubt Hydrieransätze von 4 ml Endvolumen.

13.4 Oxydation von Pteridinen

Die Luftoxydationsprodukte von hydrierten Pteridinen werden im allgemeinen Teil ausführlich besprochen. Daneben wurden 2 spezifische Oxydationsmethoden angewandt.

Die Oxydation mit Permanganat dient zur Gewinnung von Pterin-6-carbonsäure aus 6-Alkyl- oder 6-Hydroxyalkylpterinen. Zu diesem Zweck wird das zu oxydierende Pterin in verdünnter NaOH gelöst. Bei Raumtemperatur wird solange wässr. Permanganatlösung zugetropft, bis keine Entfärbung mehr auftritt. Dann wird die Probe auf dem Dampfbad kurz erhitzt und der Überschuß an Permanganat durch Zugabe von Äthanol reduziert. Nach dem Abfiltrieren und Waschen des ausgefallenen Braunsteins wird die Lösung neutralisiert und die entstandene Pterin-6-carbonsäure über Dowex 1X8 abgetrennt.

Die Oxydation von 7,8-Dihydroxanthopterin und 7,8-Dihydro-6-hydroxylumazin mit Permanganat zu Xanthopterin bzw. 6-Hydroxylumazin mißlang in kleinen Mengen, obwohl sie in der Literatur im präparativen Maßstab beschrieben ist (49).

Die Jodoxydation von hydrierten Pteridinen wurde unter 5.1 schon beschrieben. Die dazu nötige Jodlösung gewinnt man durch Suspendieren von 200 mg Jod in 4 ml Wasser. Unter kräftigem Rühren wird nun solange festes Kaliumjodid zugegeben, bis alles Jod gelöst ist.

13.5 Radioaktive Meßmethoden

Von den radioaktiven Chromatographie-Fraktionen wurden meist 0,5 ml auf Aluminiumplättchen pipettiert, getrocknet und im Zählgerät gezählt (Tracerlab, Omni/Guard).

Substanzen, die nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind, lassen sich schwer plattieren, da beim Trocknen das Lösungsmittel über den Rand der Plättchen "kriecht". Daher wurde die Aktivität des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von Glycerinaldehyd im Szintillationszähler (Packard, Tricarb) bestimmt. Methanolische Lösungen des Derivats von bekannter Konzentration wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Die Substanz wurde dann in 10 ml des Dioxan-Szintillationsgemischs wieder gelöst und in die Zählgläschen überführt. Nach der Zählung wurde für jede Probe der Quencheffekt durch Zupipettieren eines inneren Standards und nochmalige Zählung ermittelt.

13.6 Optische Meßmethoden

Absorptionsmessungen von Chromatographie-Fraktionen, Konzentrationsbestimmungen von Lösungen (Pteridine, Derivate von Glycerin und Glycerinaldehyd), die Proteinbestimmung nach Lowry und der Test 8.1 wurden durchgeführt mit Hilfe des Spektrophotometers PMQ 2 (Zeiss).

Die UV-Spektren und die Xanthinoxydase-Tests wurden aufgenommen mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer SP 800 (Leitz-Unicam).

13.7 Anreicherung der Xanthinoxydase

Der gesamte Anreicherungsgang (Gewinnung des Homogenats, Ammonsulfatfällung, Dialyse und DEAE-Chromatographie) wurde in 0,01m Tris-HCl, pH 7,5, durchgeführt. Mit Ausnahme der Chromatographie wurden alle Arbeiten in einer Kühltruhe bei etwa $+6^{\circ}$ vorgenommen.

Die Gewinnung des Leberhomogenats erfolgte wie unter 4.1.

Zur Fällung wurde zu der heftig gerührten Proteinlösung festes Ammonsulfat ganz langsam zugegeben. Die gewünschten Sättigungskonzentrationen wurden einer Tabelle entnommen (57). Nach Beendigung der Zugabe wurde die Lösung zum vollständigen Äquilibrieren noch für weitere 20 Min. gerührt. Das ausgefallene Protein wurde 10 Min. lang bei 38 000 x g abzentrifugiert (MSE, High-speed 18).

Auf die mit Tris-Puffer äquilibrierte DEAE-Säule wurde die dialysierte Proteinlösung aufgetragen und einsickern gelassen. Zur Erzeugung eines linearen Salzgradienten wurde ein entsprechendes Mischgefäß verwendet. Seine vordere Kammer wurde mit 250 ml Tris-Puffer beschickt, die hintere mit 250 ml 0,3m (bzw. 0,2m) NaCl, gelöst im gleichen Puffer. Die Pumpgeschwindigkeit betrug etwa 38 ml/Std., 100 Fraktionen a 5 ml wurden gesammelt.

Xanthinoxydase aus Milch wurde als reines Präparat eingesetzt (Boehringer).

13.8 Spezielles

pH-Werte wurden mit einer Einstabelektrode (Radiometer, Kopenhagen) gemessen. Die Meßwerte für die pH-Kurven (4.34 und 8.23) wurden jeweils am Ende der Inkubationszeit ermittelt, jedoch noch vor der Beendigung der enzymatischen Reaktion durch Aufkochen bzw. Zugabe von Trichloressigsäure.

An weiteren wichtigen Geräten wurden verwendet: Rotationsverdampfer, Schüttelinkubator mit Flüssigkeitsthermostat, Christ-Kühlzentrifuge.

Literaturverzeichnis

1.	E.L.Patterson, H.P.Broquist, A.M.Albrecht, M.H.v.Saltza, E.L.R.Stokstad	J.Amer.chem.Soc. 77, 3168 (1955)
2.	E.L.Patterson, R.Milstrey, E.L.R.Stokstad	J.Amer.chem.Soc. 78, 5868 (1956)
3.	E.L.Patterson, M.H.v.Saltza, E.L.R.Stokstad	J.Amer.chem.Soc. 78, 5871 (1956)
4.	J.Cowperthwaite, M.M.Weber, L.Packer, S.H.Hutner	Ann.N.Y.Acad.Sci. 56, 972 (1953)
5.	H.Rembold, H.Metzger	Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 329, 291 (1962)
6.	M.Viscontini, M.Schoeller, E.Loeser, P.Karrer, E.Hadorn	Helv.chim.Acta 38, 397 (1955)
7.	M.Viscontini, A.Kühn, A.Egelhaaf	Z.Naturf. 11b, 501 (1956)
8.	M.Viscontini, H.Schmid	Experientia 11, 390 (1955)
9.	T.Goto, T.Hama	Proc.Imp.Acad.(Tokyo) 34, 724 (1958)
10.	Y.Mori, J.Matsumoto, T.Hama	Z.vergl.Physiol. 43, 531 (1960)
11.	G.H.Schmidt, M.Viscontini	Helv.chim.Acta 45, 1571 (1962)
12.	H.Rembold	Pteridine-Chemistry, Pergamon Press, Oxford 1964, S 465
13.	A.Butenandt, H.Rembold	Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 311, 79 (1958)
14.	H.Rembold, G.Hanser	Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 339, 251 (1964)
15.	H.Rembold, L.Buschmann	Chem.Ber. 96, 1406 (1963)
16.	I.Ziegler	Z.Naturf. 15b, 460 (1960)
17.	I.Ziegler	Biochem.Z. 337, 62 (1963)
18.	S.Kaufman	J.biol.Chem. 234, 2677 (1959)

19. S.Kaufman — Proc.Natl.Acad.Sci. 50, 1085 (1963)

20. A.R.Brenneman, S.Kaufman — Biochem.Biophys.Res.Com. 17, 177 (1964)

21. A.Tietz, M.Lindberg, E.P.Kennedy — J.biol.Chem. 239, 4081 (1964)

22. S.Nakamura, A.Jehiyama, O.Hayaishi — Fed.Proc. 24, 604 (1965)

23. D.D.Hagerman — Fed.Proc. 23, 480 (1964)

24. G.M.Brown, R.A.Weisman, D.A.Molnar — J.biol.Chem. 236, 2534 (1961)

25. T.Shiota, M.N.Disraeli — Biophys.Biochim.Acta 52, 467 (1961)

26. T.Shiota, M.N.Disraeli, M.P.McCann — J.biol.Chem. 239, 2259 (1964)

27. T.H.D.Jones, J.J.Reynolds, G.M.Brown — Biochem.Biophys.Res.Com. 17, 486 (1964)

28. T.Shiota, M.P.Palumbo — J.biol.Chem. 240, 4449 (1965)

29. H.Metzger — Dissertation, München 1965

30. H.Rembold, H.Metzger — Z.Klin.Chem. 3, 208 (1965)

31. H.Rembold, H.Metzger — Chem.Ber. 96, 1395 (1963)

32. M.Friedkin, E.J.Crawford, D.Misra — Fed.Proc. 21, 176 (1962)

33. T.Shiota, M.N.Disraeli, M.P.McCann — Biochem.Biophys.Res.Com. 7, 194 (1962)

34. B.L.O'Dell, J.M.Vandenbelt, E.S.Bloom, J.J.Pfiffner — J.Amer.chem.Soc. 69, 250 (1947)

35. A.Bobst, M.Viscontini — Helv.chim.Acta 49, 875 (1966)

36. H.Rembold, H.Metzger — Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 348, 194 (1967)

37. L.Buschmann — Dissertation, München 1963

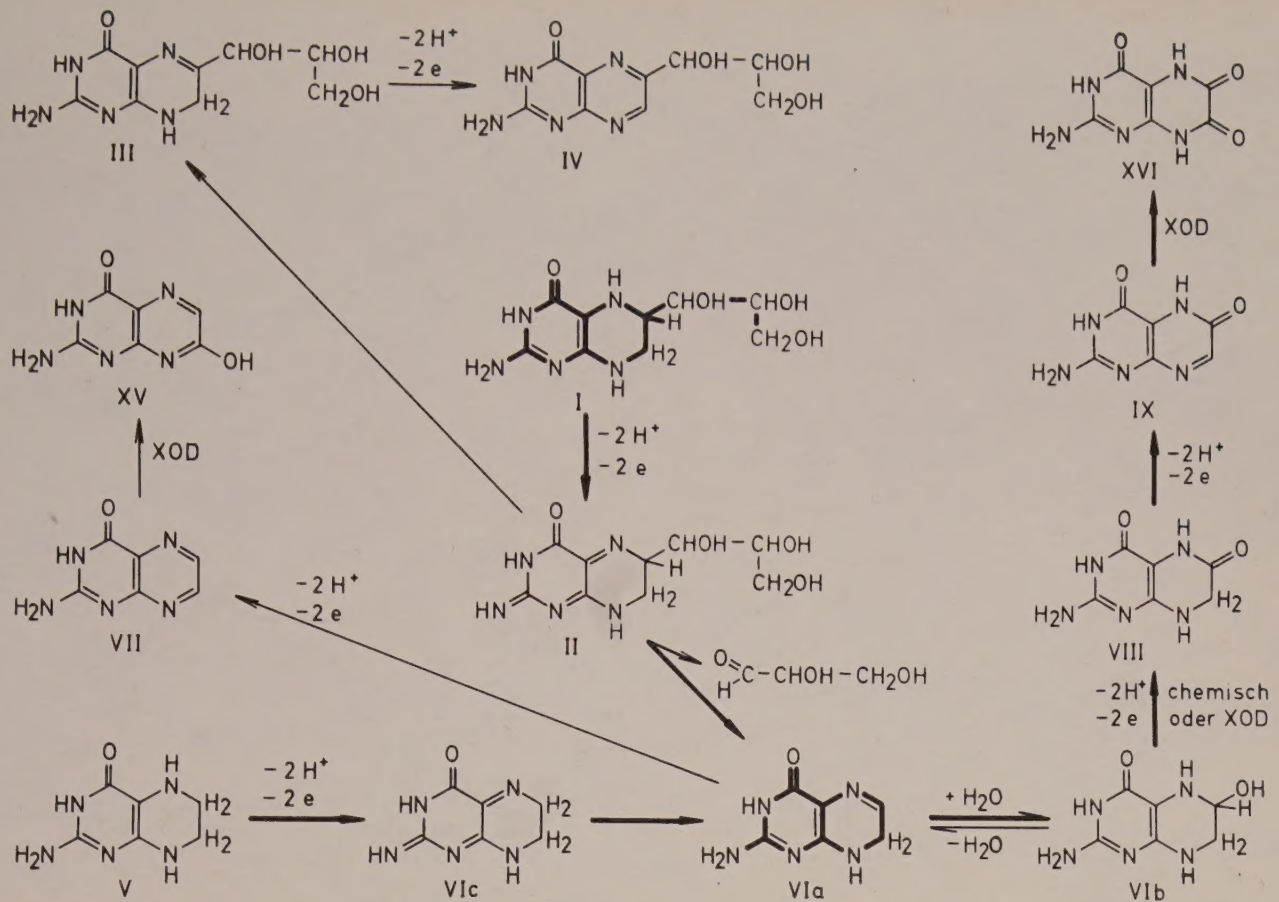
38.	F.Simmersbach	Dissertation, München 1967
39.	H.Metzger	unveröffentlicht
40.	W.Pfleiderer	Chem.Ber. 90, 2604 (1957)
41.	C.van Baalen, H.S.Forrest	J.Amer.chem.Soc. 81, 1770 (1959)
42.	H.S.Forrest, C.van Baalen, M.Viscontini, M.Piraux	Helv.chim.Acta 43, 1005 (1960)
43.	S.Nawa, H.S.Forrest	Nature 196, 169 (1962)
44.	A.Stuart, H.C.S.Wood	J.chem.Soc. (London) 1963, 4186
45.	S.Nawa	Bull.chem.Soc.(Japan) 33, 1555 (1960)
46.	O.H.Lowry	J.biol.Chem. 193, 265 (1951)
47.	F.Bergmann, H.Kwietny	Biophys.Biochim.Acta 33, 29 (1959)
48.	W.Pfleiderer, H.Zondler	Chem.Ber. 99, 3008 (1966)
49.	A.Albert, S.Matsuura	J.chem.Soc.(London) 1962, 2162
50.	R.L.Blakley	Biochem.J. 65, 331 (1957)
51.	S.Kaufman	J.biol.Chem. 239, 332 (1964)
52.	M. Viscontini, A.Bobst	Helv.chim.Acta 48, 816 (1965)
53.	T.Floystrup, M.A.Schou, H.M.Kalckar	Act.chem.scand. 3, 985 (1949)
54.	H.M.Rauen, C.v.Haller	Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 286, 96 (1950)
55.	C.K.Cain, M.F.Malette, E.C.Taylor	J.Amer.chem.Soc. 68, 1996 (1946)
56.	C.Weygand	Organisch-chemische Experimentierkunst (2.Aufl.) S 158 Barth-Verlag, Leipzig 1948
57.	S.P.Colowick, N.O.Kaplan	Methods in Enzymology, S 76 Academic Press, New York 1955

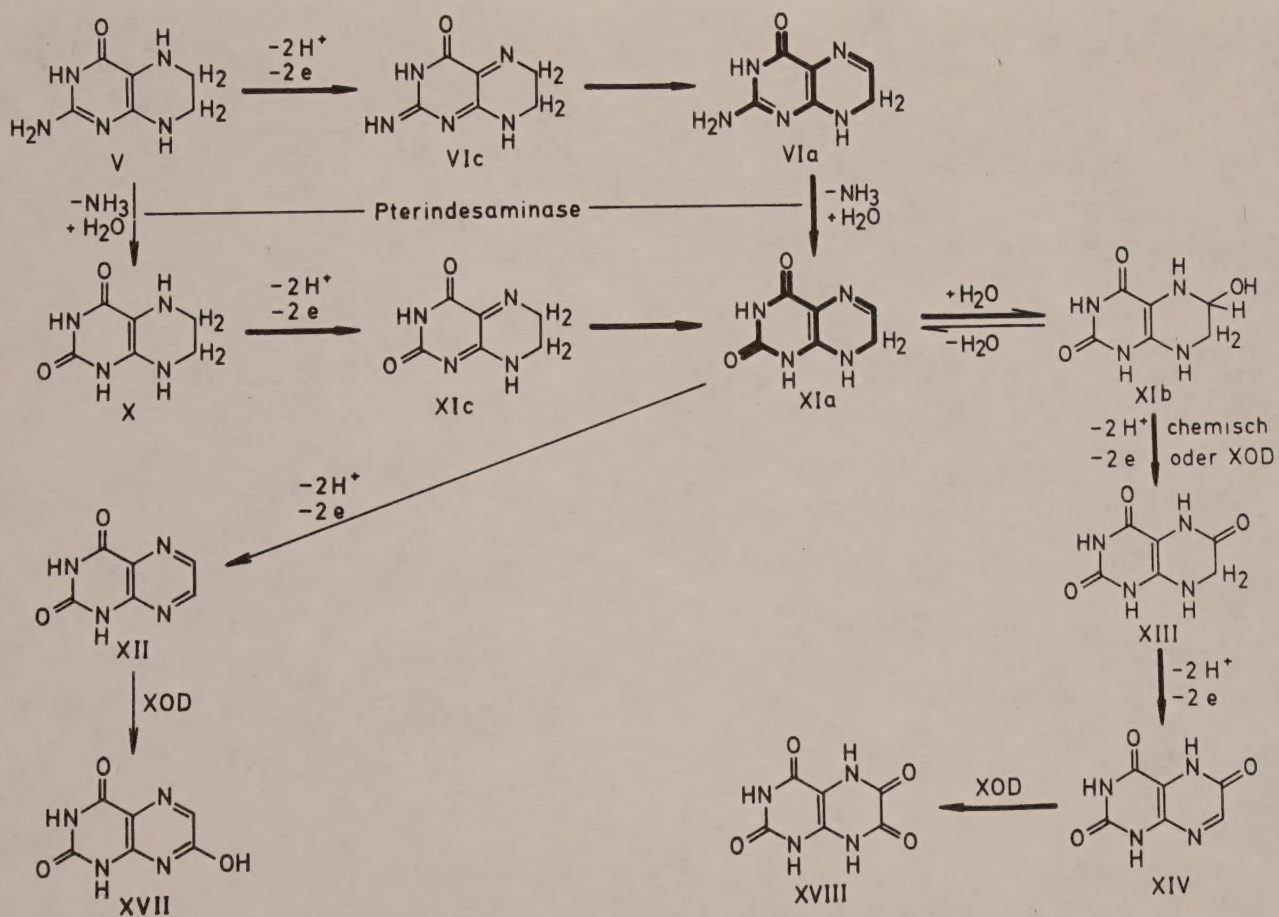
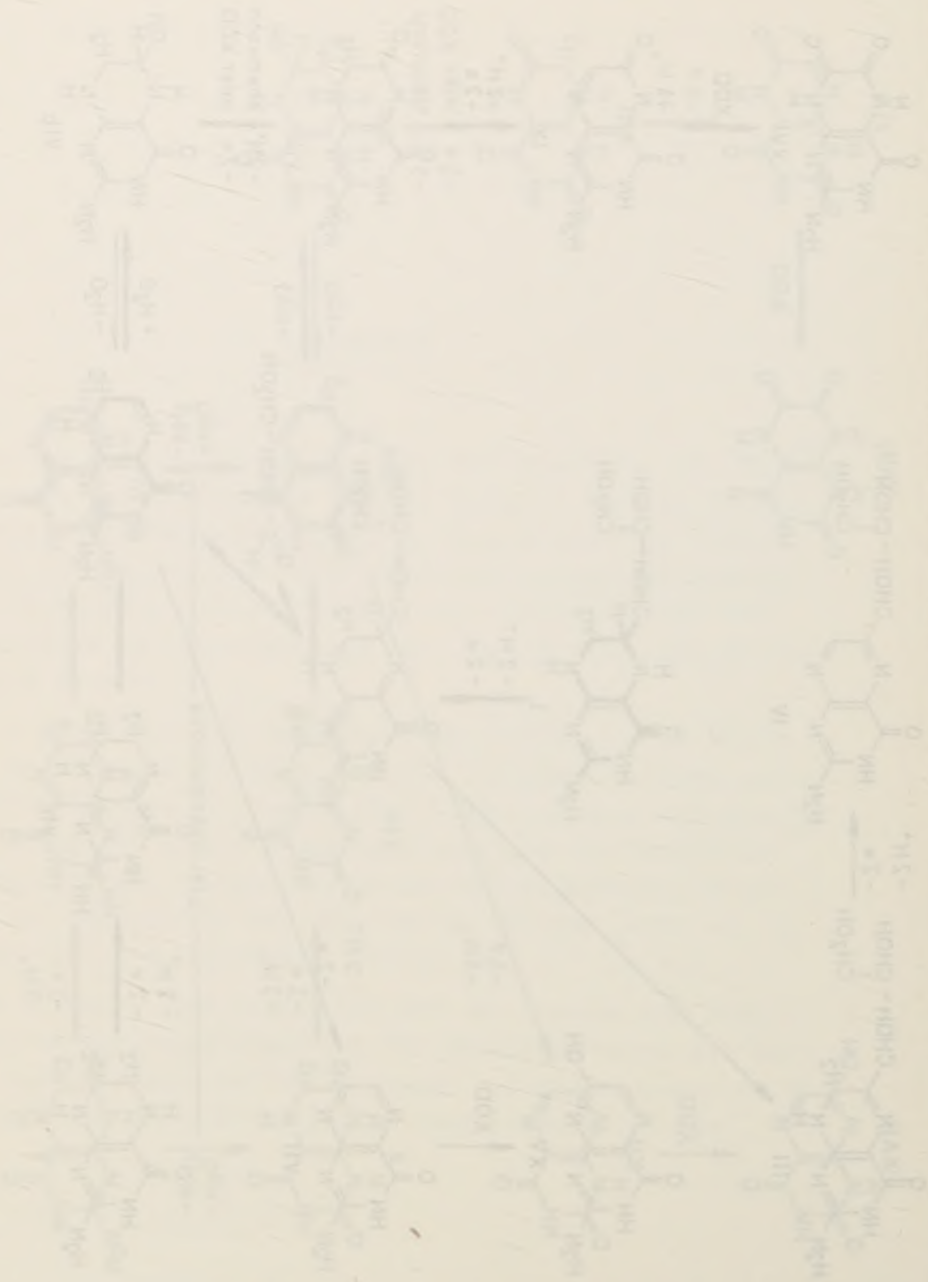
Lebenslauf

Am 1.9.1937 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Dr. Wilhelm Gutensohn und seiner Frau Karola, geborene Oefele, in Fürstenfeldbruck/Oberbayern geboren. Nach Besuch der Volksschule in Wien, Scheideldorf/Niederösterreich und Schlehdorf/Oberbayern trat ich 1948 in die Oberrealschule mit Schülerheim in Hohenschwangau ein, wo ich 1957 mein Reifezeugnis erhielt.

Als Stipendiat des Maximilianeums begann ich im Winter 1957 das Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Sommer 1960 legte ich dort die Diplomvorprüfung ab. Anschließend studierte ich als Austauschstudent für ein Studienjahr an der Universität von Paris. Nach der Rückkehr an die Universität München legte ich im Sommer 1963 die Diplomhauptprüfung ab.

Im Dezember 1963 begann ich mit der Diplom- und Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Professor Dr. A. Butenandt und Privatdozent Dr. H. Rembold, mit der ich bis August 1967 beschäftigt war.


III
IV
XVI
XOD
XV
I
IX
$-2H^+$ $-2e$
VII
II
VIII
$-2H^+$ $-2e$ chemisch oder XOD
$+H_2O$ $-H_2O$
V
VIc
VIa
VIb


V
VIc
VIa
$-NH_3$ $+H_2O$
Pterindesaminase
$-NH_3$ $+H_2O$
X
XIc
XIa
XIb
$-2H^+$ $-2e$ chemisch oder XOD
XII
XIII
XOD
XVII
XVIII
XIV